

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE
À L'OBTENTION DE LA
MAÎTRISE EN GÉNIE DE LA SANTÉ
M.Ing.

PAR
BORIS CHAYER

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION *IN VITRO* D'UN ALGORITHME DE
CALCUL DES VÉLOCITÉS DES GLOBULES ROUGES DANS LA
MICROCIRCULATION SANGUINE

MONTREAL, LE 5 OCTOBRE 2007

© Boris Chayer, 2007

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ
PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Jacques de Guise, directeur de mémoire
LIO à l'École de technologie supérieure

M. Guy Cloutier, codirecteur de mémoire
LBUM à l'Université de Montréal

Mme Nicola Hagemeister, présidente du jury
LIO à l'École de technologie supérieure

M. Lyes Kadem, membre du jury, examinateur externe
Concordia University

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC
LE 30 AOÛT 2007
À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

DÉVELOPPEMENT ET CARACTÉRISATION *IN VITRO* D'UN ALGORITHME DE CALCUL DES VÉLOCITÉS DES GLOBULES ROUGES DANS LA MICROCIRCULATION SANGUINE.

Boris Chayer

SOMMAIRE

Le but de cette étude était de développer et d'évaluer la précision d'un algorithme pouvant calculer la vitesse des globules rouges dans la microcirculation sanguine *in vivo*. La réalisation d'un modèle *in vitro* qui reproduit fidèlement les images de la microcirculation sanguine et l'utilisation d'images de synthèse a permis d'atteindre ces objectifs.

Le modèle *in vitro* se compose principalement d'un micro tube de verre, d'un pousse seringue et d'un microscope optique équipé d'une caméra rapide. Le sang est pompé dans le micro tube et les images recueillies par la caméra sont ensuite traitées par ordinateur. Les images de synthèse sont créées par une projection 2D d'un modèle mathématique de microcirculation sanguine tridimensionnelle. Elles ont été produites expressément pour recréer les effets optiques produits par le microscope. L'algorithme utilisé pour calculer la vitesse des globules rouges est la corrélation croisée. La taille de la fenêtre et de l'étampe a été optimisée pour les images de flux sanguin. Les vecteurs vitesses erronés sont filtrés de façon temporelle et spatiale.

L'estimation du débit sanguin à partir de la vitesse des globules rouges a été comparée au débit de la pompe afin de valider la précision de l'algorithme. L'analyse des résultats montre que pour des débits physiologiques variant de 1 à 27 $\mu\text{L/h}$, la dispersion des erreurs moyennes est de 2,3%. Puisque la précision des vitesses calculées est bonne, l'algorithme pourra être utilisé sur des images provenant de microscopie intravitale.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION *IN VITRO* OF AN ALGORITHM TO CALCULATE THE VELOCITY OF RED BLOOD CELLS IN BLOOD MICROCIRCULATION

Boris Chayer

ABSTRACT

The aim of this study was to develop and evaluate the precision of an algorithm that can compute the speed of red blood cells in blood microcirculation *in vivo*. The creation of an *in vitro* model which accurately reproduced the images of the blood microcirculation and the use of virtual blood flow images enabled the achievement of these objectives.

The micro fluidic device is composed of a glass capillary, a syringe pump and an optical microscope equipped with a high-speed camera. The blood is pumped within the glass capillary and the images recorded by the camera are then post-treated by a computer. The composite images were created by a 2D projection of a three-dimensional mathematical blood microcirculation model. They were created expressly to reproduce the optical effects produced by the microscope. The algorithm used to calculate the speed of the red blood cells is the cross-correlation. The size of the first and second interrogation windows were optimized for the images of blood flow. The spurious speed vectors were filtered by temporal and spatial filters.

The flow estimate from the speed of red blood cells was compared to the pump flow to validate the precision of the speed algorithm. The analysis of results shows a mean error dispersion of 2.3% for physiological flows between 1 and 27 $\mu\text{L/h}$. Thus, the algorithm can be used on intravital microscopic images since the precision of the red blood cell speed is assured.

REMERCIEMENTS

Merci d'abord à Guy Cloutier pour avoir fait de mon métier un sujet de recherche et de mon sujet de recherche un métier. Ses qualités de visionnaire et de chef de clan doublées de sa disponibilité font de lui une ressource inestimable pour tous les LBUMiens. Merci ensuite à Jacques de Guise pour ses corrections efficaces puisque aucun logiciel de traitement de texte ne fait la conversion automatique de bande dessinée à mémoire de maîtrise.

Merci, bien sûr, à tous les membres du LBUM sans qui les dîners internationaux seraient de simples dîners traditionnels. Un merci spécial aux thésards et post doctorants pour leur encadrement dans les méandres de la théorie et des équations, je pense en particulier à Marianne Fenech, Ékathérina Stoyanova, François Yu, et Jérémie Fromageau.

Cette épopée scolaire n'aurait pu avoir lieu sans la complicité et les maints encouragements de deux complices extraordinaires. Je parle bien sûr de mon binôme et grand ami Guillaume Tremblay et de mon acolyte et compagnon d'escalade Damien Garcia qui m'ont joyeusement fait croire que la maîtrise, dans trois mois c'est fini.

Merci encore à ma correctrice et petite grande sœur adorée pour avoir usé ses yeux à l'écran de mes lacunes grammaticales, orthographiques, syntaxiques, ... Puis Merci avec un grand **M** à ma compagne Mélissa qui est pour moi un modèle de persévérance et de jovialité sans égal ainsi qu'à mon fils Eloi de me servir d'excuse parfaite pour arrêter ici ma carrière d'étudiant.

J'aimerais finalement prendre une page de silence en l'honneur de Momofuku Ando décédé le 5 janvier 2007.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
SOMMAIRE	i
ABSTRACT	ii
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1.1 Le sang.....	3
1.1.1 Les globules rouges.....	4
1.1.2 L'hémorhéologie.....	5
1.1.3 La micro hémorhéologie.....	6
1.1.4 L'hémoglobino-pathie ciblée par cette étude	8
1.2 La microscopie.....	9
1.2.1 La résolution	9
1.2.2 La profondeur de champ	10
1.2.3 La profondeur de corrélation	10
1.2.4 La caméra vidéo.....	12
1.3 La microscopie intravitale.....	13
1.3.1 Les mouvements physiologiques	14
1.3.2 La dilatation et la contraction des vaisseaux.....	14
1.3.3 La superposition de structures	15
1.3.4 La diffusion de la lumière	16
1.3.5 Le bruit de la caméra.....	17
1.4 Le calcul de la vitesse des particules	17
1.4.1 La corrélation croisée.....	18
1.4.2 Le suivi de particules	22
1.4.3 Le gradient d'intensité temporelle	23
1.5 Les méthodes de validation.....	24
1.5.1 Les modèles <i>in vitro</i>	24
1.5.2 Les images de synthèse.....	27
1.5.3 La modélisation informatique	28
1.6 Synthèse et objectifs	30

CHAPITRE 2	CONCEPTION DU MODÈLE <i>IN VITRO</i>	32
2.1	Le modèle <i>in vitro</i>	32
2.2	Le fantôme micro vasculaire	34
2.3	Le sang	36
2.4	Le pousse seringue	38
2.4.1	Étude de la constance du pousse seringue	39
2.5	La microscopie	40
2.5.1	La profondeur de corrélation	40
2.6	L'acquisition vidéo	43
2.7	L'éclairage de la scène	44
2.8	Les images de synthèse	45
2.9	Synthèse du chapitre deux	47
CHAPITRE 3	LA CONCEPTION DE L'ALGORITHME DE CORRÉLATION	49
3.1	Les dimensions de l'étampe et de la fenêtre	50
3.1.1	La forme de la fenêtre et de l'étampe	52
3.1.2	Le chevauchement des étampes	53
3.1.3	Test in vitro pour trois grandeurs de fenêtres	55
3.2	Les filtres	57
3.2.1	Étude de différents filtres	60
3.2.2	Le coefficient de corrélation	62
3.2.3	Les filtres retenus	63
3.3	L'estimation du débit	66
3.3.1	L'intégrale numérique et la vitesse moyenne	67
3.3.2	La segmentation	67
3.3.3	Les autres sources d'erreurs	68
3.4	Synthèse du chapitre trois	69
CHAPITRE 4	VALIDATION EXPÉRIMENTALE	70
4.1	Protocole expérimental	70
4.2	La stabilité du modèle <i>in vitro</i>	72
4.3	L'influence du plan focal sur la précision du calcul des vitesses	73
4.4	Étude de la profondeur de corrélation	76
4.5	La précision de l'algorithme de corrélation	78
4.5.1	Expérience avec du sang complet	80
4.5.2	Débits estimés en fonction des dimensions de la fenêtre	82
4.6	Synthèse du chapitre quatre	83
CHAPITRE 5	ANALYSE DES RÉSULTATS	85
5.1	Le modèle <i>in vitro</i>	85
5.1.1	La taille des marqueurs	85
5.1.2	Le taux d'ensemencement	87
5.1.3	Les vitesses	88
5.1.4	La stabilité du modèle <i>in vitro</i>	90
5.1.5	La précision du modèle <i>in vitro</i>	91

5.2	Le plan focal	92
5.3	Étude de la profondeur de corrélation.....	93
5.4	L'algorithme de corrélation	94
5.4.1	Analyse des deux méthodes d'estimations du débit	94
5.4.2	Le sang reconstitué versus le sang lavé	96
5.4.3	La précision de l'algorithme	98
5.5	Synthèse du chapitre cinq	99
CONCLUSION.....		101
RECOMMANDATIONS		103
ANNEXE A DESCRIPTION DES FILTRES		104
ANNEXE B RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....		107
BIBLIOGRAPHIE.....		114

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1	Aperçu de la profondeur de corrélation théorique 12
Tableau 2	Dimension d'un pixel en fonction de l'objectif utilisé..... 44
Tableau 3	Récapitulation des paramètres expérimentaux. 72
Tableau 4	Tableau des taux de cisaillement moyens en fonction du débit. 97

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1	Échantillon de sang complet 3
Figure 2	Coupe d'un capillaire..... 4
Figure 3	Profil de vitesses en fonction du flux 6
Figure 4	Propriété de la circulation sanguine 7
Figure 5	Images de microscopie intravitale..... 15
Figure 6	Image d'un crémaster de rat 16
Figure 7	Images typiques de μ PIV. 19
Figure 8	Fenêtre, étampe, et plan de corrélation 21
Figure 9	Vecteurs vitesses calculés sur une image <i>in vivo</i> 25
Figure 10	Modèle <i>in vitro</i> de Shevkopyas..... 26
Figure 11	Images de synthèse..... 28
Figure 12	Image provenant d'une simulation informatique 30
Figure 13	Schéma du modèle <i>in vitro</i> et de ses composantes..... 32
Figure 14	Vue d'ensemble du modèle <i>in vitro</i> 33
Figure 15	Schéma du modèle <i>in vitro</i> 35
Figure 16	Photo du fantôme microvasculaire..... 35
Figure 17	Images de microscopie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> 37
Figure 18	Déplacement du pousse seringue pendant une seconde..... 40
Figure 19	Visualisation de l'effet de la profondeur de corrélation. 41
Figure 20	Images de globules rouges prises à 40X. 43
Figure 21	Image des globules dans le modèle informatique en 3D..... 45
Figure 22	Image de synthèse. 47
Figure 23	Organigramme de l'algorithme de corrélation..... 50
Figure 24	Les vecteurs des déplacements selon deux chevauchements différents... 54
Figure 25	Carte des vitesses dans des artérioles 55
Figure 26	Profils de vitesses calculés en utilisant trois fenêtres..... 57

Figure 27	Agrandissement d'une image <i>in vitro</i>	58
Figure 28	Les profils de vitesses créés par l'utilisation de différents filtres.	61
Figure 29	Effet du seuillage par l'utilisation du coefficient de corrélation.	63
Figure 30	Histogrammes des angles et des modules de vitesses	64
Figure 31	Débit moyen en fonction du nombre d'images moyennées.	65
Figure 32	Variance du débit moyen en fonction du nombre d'images dans la moyenne.	66
Figure 33	Débit instantané moyenné sur 50 images	73
Figure 34	Estimés du débit en fonction de la position du plan focal.	74
Figure 35	Images des séquences vidéo à différents plans focaux.	75
Figure 36	Profil de vitesses obtenu sur les images de synthèse	77
Figure 37	Débits estimés en fonction du débit de la pompe.	79
Figure 38	Débits estimés en fonction du débit de la pompe pour du sang complet .	81
Figure 39	Estimé des débits pour deux grandeurs de fenêtres.	83
Figure 40	Taux d'hématocrite dans la microcirculation	87
Figure 41	Image <i>in vivo</i> de microcirculation sanguine.	88
Figure 42	Vitesse moyenne et pression moyenne en fonction de la dimension des vaisseaux dans la microcirculation.	89
Figure 43	Image microscopique d'agrégats de sang humain en rouleaux	98
Figure 44	Organigramme du filtre global.	104
Figure 45	Organigramme du filtre moyennneur.	105
Figure 46	Organigramme du filtre temporel.	106
Figure 47	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 1 $\mu\text{L/h}$	108
Figure 48	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 2 $\mu\text{L/h}$	108
Figure 49	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 3 $\mu\text{L/h}$	109
Figure 50	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 4 $\mu\text{L/h}$	109
Figure 51	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 5 $\mu\text{L/h}$	110
Figure 52	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 8 $\mu\text{L/h}$	110
Figure 53	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 11 $\mu\text{L/h}$	111

Figure 54	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 14 $\mu\text{L/h}$	111
Figure 55	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 17 $\mu\text{L/h}$	112
Figure 56	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 20 $\mu\text{L/h}$	112
Figure 57	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 23 $\mu\text{L/h}$	113
Figure 58	Profile de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 26 $\mu\text{L/h}$	113

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SIGLES

MEMS	Microelectromechanical System
RBC	Red Blood Cell, globule rouge
PIV	Particule Imaging Velocimetry
PTV	Particule Tracking Velocimetry
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
CMOS	Complementary Metal Oxide Semi-conductor, technologie de transistor
EDTA	L'Acide Ethylène-Diamine-Tétracétique, empêche la coagulation du sang
CCD	Charge Coupled Device, technologie de transistor

INTRODUCTION

Une grande variété de phénomènes interagissent continuellement pour maintenir le corps humain en vie. Des maladies, telles le diabète et la bêta-thalassémie, modifient les propriétés biologiques et mécaniques des globules rouges. Ces modifications pourraient avoir des influences sur la micro circulation sanguine des patients atteints de cette maladie. Les artérioles, capillaires et veinules sont des endroits privilégiés pour l'étude du flux sanguin puisque c'est là que les échanges gazeux, nutritionnels et immunitaires ont lieu. Une méthode très utile pour comprendre le comportement du sang dans les petits vaisseaux est la microscopie optique, appelée *intravitale* lorsqu'elle est utilisée *in vivo*. Pour étudier les effets d'une pathologie sur la microcirculation il est nécessaire d'analyser les images microscopiques. Puisque aucun logiciel commercial ne convient pour ce type d'application, il faut donc développer des outils et quantifier leurs précisions avant de les utiliser en microscopie intravitale.

Mon projet consiste à développer et à évaluer un algorithme capable de calculer la vitesse des globules rouges dans la microcirculation afin de pouvoir observer les modifications de l'écoulement causées par la bêta-thalassémie. La fabrication d'un modèle *in vitro* servira de référence pour mesurer la précision des vitesses calculées. Le modèle *in vitro* est constitué d'un tube de 30 μm de diamètre où le sang circule grâce à une pompe. Une caméra est fixée au microscope et filme les globules rouges qui passent dans un micro tube. Les images sont ensuite traitées par ordinateur pour calculer les vitesses des globules. La vitesse des globules rouges permet d'évaluer plusieurs autres propriétés de la microcirculation tels l'estimation du débit et le profil des vitesses. Appliqués dans un contexte de microscopie intravitale, ces paramètres pourront caractériser les désordres micro circulatoires chez des modèles animaux atteints de bêta-thalassémie.

Le premier chapitre, revue de la littérature, présente les notions scientifiques se rapportant au sang. L'état de l'art en microscopie intravitale et en calcul de vitesses par ordinateur y est aussi présenté. Le second chapitre décrit les manipulations qui ont permis de concevoir le modèle *in vitro* de microcirculation tandis que le chapitre trois décrit la conception de l'algorithme de calcul des vitesses. Les résultats recueillis à l'aide du modèle *in vitro* sont présentés au chapitre quatre. Le chapitre cinq propose une analyse des résultats. Les sources d'erreurs et la précision des calculs de vitesses des globules rouges y sont discutées. La conclusion fait un retour sur la démarche scientifique suivie ainsi que sur la précision du modèle *in vitro* et de l'algorithme.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Ce chapitre s'intéresse aux notions de base qui seront utilisées tout au long du projet. Les notions de rhéologie sanguine y sont brièvement présentées; il y est aussi fait état des derniers avancements scientifiques, tant dans le domaine de la microscopie intravitale qu'en calcul de vitesses par ordinateur.

1.1 Le sang

Le sang remplit plusieurs fonctions dans le corps humain. Il transporte l'oxygène vers les différents organes du corps et évacue le dioxyde de carbone. Il régule la température du corps et le pH, assure la réponse immunitaire, transporte les nutriments et évacue les déchets vers les reins. Le sang se compose de différents types de cellules spécialisées, tels les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes (figure 1).

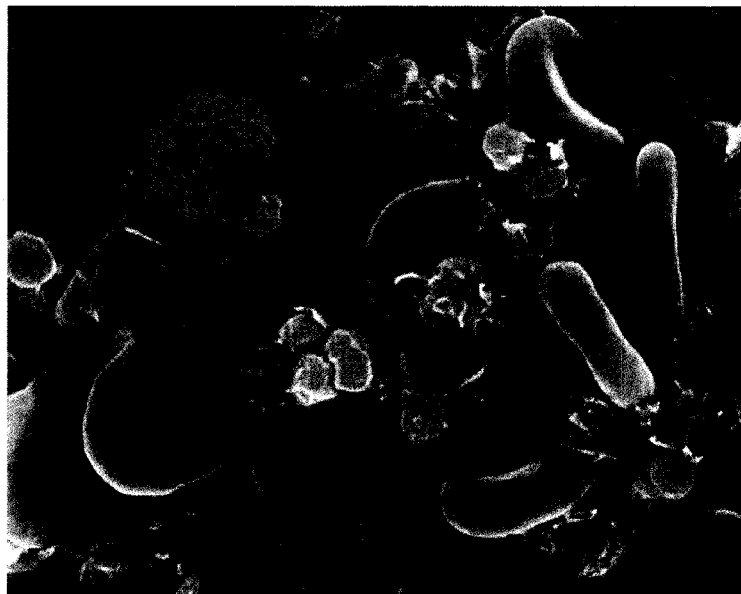


Figure 1 Échantillon de sang complet observé au microscope électronique. Les érythrocytes y figurent en rouge, les leucocytes en vert et les plaquettes en jaune (Kunkel 2005).

Le taux d'hématocrite est le volume qu'occupent les érythrocytes ou globules rouges dans un volume de sang total. Chez l'homme, le taux d'hématocrite est d'environ 45% dans la circulation systémique. Les leucocytes ou globules blancs et les corpuscules de Bizzozero, ou plaquettes, représentent moins de 1% du sang complet. Le volume restant est appelé plasma sanguin. Constitué à 90% d'eau, le plasma est une solution de minéraux et de protéines (Farabee 2006).

1.1.1 Les globules rouges

Les globules rouges sont spécialisés dans le transport de l'oxygène. Ils contiennent 200 millions de molécules d'hémoglobine pour fixer l'oxygène et le CO_2 . Leur forme est biconcave, ce qui augmente leur surface et maximise les échanges gazeux avec les tissus vasculaires. Ils mesurent $7\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre par $2\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur et un adulte en compte en moyenne 25×10^{18} . Pour circuler dans les capillaires, plus petits qu'eux ($\approx 5\text{ }\mu\text{m}$), les globules rouges se déforment (figure 2). Cette aptitude est importante pour faciliter leur passage dans les capillaires.



Figure 2 Coupe d'un capillaire, en ocre. À l'intérieur, on remarque les globules rouges déformés pour faciliter leur passage (Kunkel 2005).

1.1.2 L'hémorhéologie

L'hémorhéologie est la science qui étudie le comportement du sang sous diverses contraintes, tel le cisaillement. D'un point de vue physique, on sait que le sang a un comportement non Newtonien dû aux phénomènes d'agrégation et de déformation des globules rouges. Les fluides non Newtoniens sont caractérisés par le changement de leur viscosité en fonction du taux de cisaillement. Lorsque le sang est soumis à une très petite force de cisaillement, les globules rouges se collent les uns aux autres pour former des agrégats. La viscosité du sang augmente proportionnellement avec la taille des agrégats. Lorsque la vitesse du sang augmente, le cisaillement augmente et les globules rouges se déforment, ce qui rend le sang moins visqueux.

Ce changement de viscosité est observable lorsqu'on trace le profil des vitesses transversales au vaisseau sanguin. Un fluide visqueux aura tendance à former un profil parabolique aplati alors qu'un fluide moins visqueux produira un profil ressemblant à une parabole. À la figure 3, on remarque que le profil est bien parabolique pour un écoulement sans agrégation pour un flux normal, en haut à gauche. Le profil s'aplatit lorsque le flux ralentit ou lorsque le sang est traité avec du Dextran 500 pour augmenter ses propriétés d'agrégation, en bas à droite (Popel and Johnson. 2005).

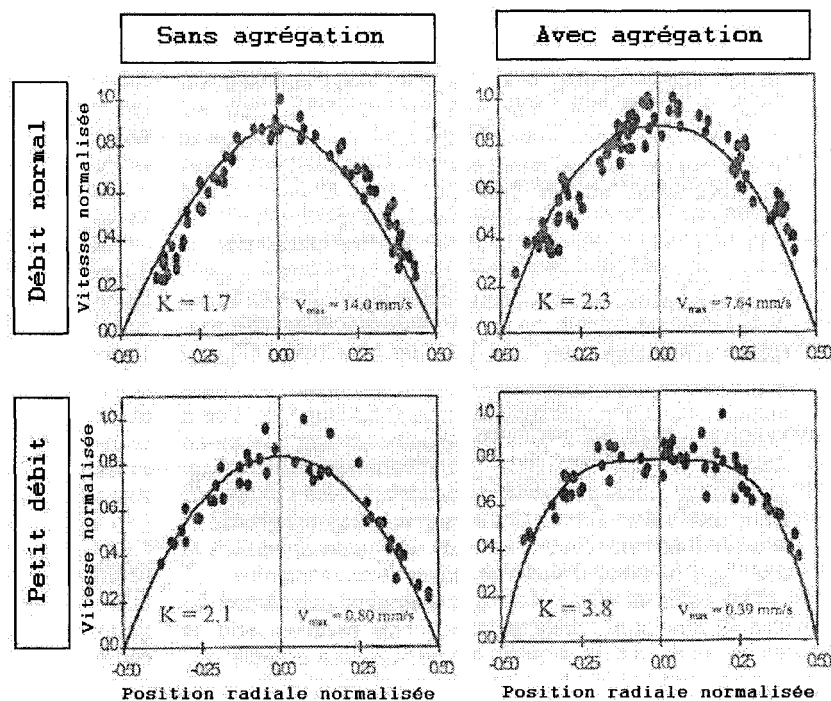


Figure 3 Profil de vitesses en fonction du flux et des propriétés d'agrégation du sang (Popel and Johnson. 2005). L'abscisse correspond à la position le long du diamètre. L'axe des ordonnées représente les vitesses normalisées. K représente l'exposant de la courbe parabolique, V_{max} est égal à la valeur maximum utilisée pour normaliser les courbes.

L'angioarchitecture influence aussi le comportement du sang. Si le sang transite dans des vaisseaux cylindriques, le cisaillement sera plus grand que dans un vaisseau ayant une coupe transverse autre que circulaire (Schmid-Schonbein 1999). On remarque par ailleurs que les branchements entre les vaisseaux augmente l'agrégation érythrocytaire dans les veinules (Popel and Johnson. 2005).

1.1.3 La micro hémorhéologie

Les micro vaisseaux incluent généralement les artérioles, les capillaires et les veinules de 5 à 50 μm de diamètre (Parthasarathi, Japee et al. 1999). La microcirculation joue un

rôle important pour maintenir l'organisme en vie puisque c'est là qu'ont lieu les échanges gazeux entre les globules rouges et les différents organes du corps.

La figure 4 montre bien que la microcirculation est l'endroit où la surface totale des vaisseaux sanguins est la plus grande dans l'organisme. La vitesse du sang y est minimum et peut même être complètement arrêtée par des blocages momentanés. La pression dans les artérioles diminue progressivement en fonction de la ramification des capillaires.

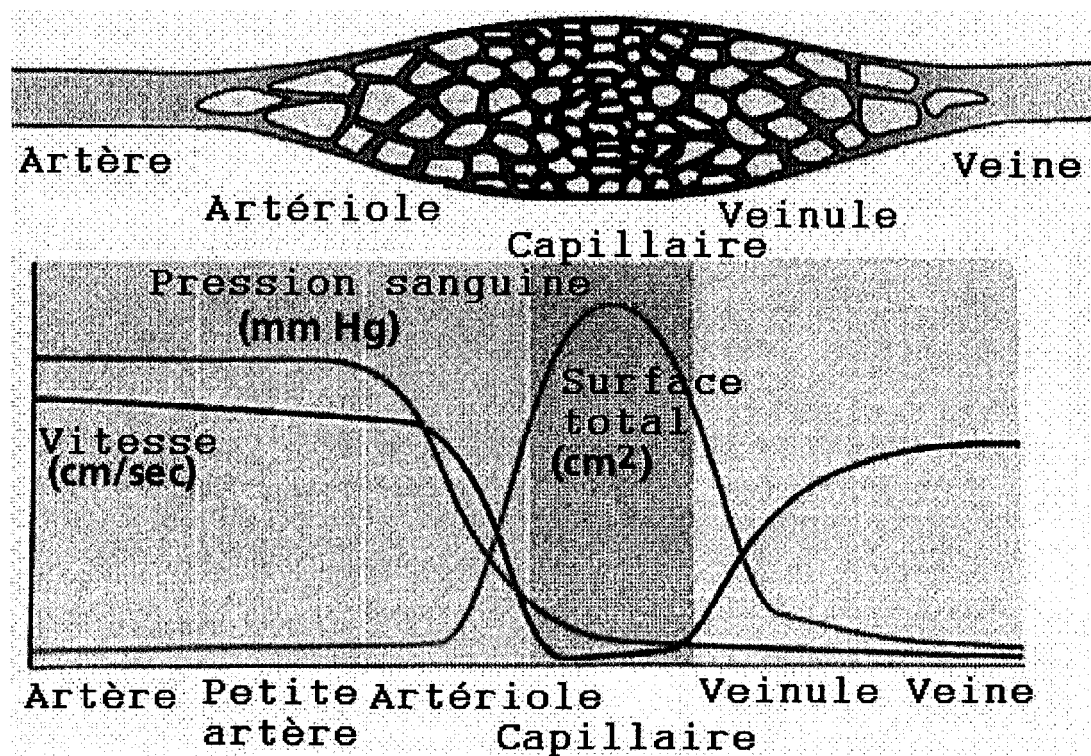


Figure 4 Propriété de la circulation sanguine du macro au micro vaisseau (Farabee 2006).

En micro-hémorhéologie, les principes de base comme le taux d'hématocrite ne s'appliquent pas directement puisque les vaisseaux sont très petits. Près de la paroi des vaisseaux sanguins se forme une mince couche pauvre en cellules où il n'y a pas de globules rouges. Ce phénomène de couche pauvre se produit dans tous les vaisseaux,

mais en microcirculation il est non négligeable en regard de la taille du vaisseau. Farhaeus fut le premier à décrire le manque de consistance entre l'hématocrite systémique et l'hématocrite efficace. L'hématocrite efficace correspond à la fraction volumique de globules rouges transportée par un vaisseau spécifique par rapport au volume de plasma. Dans la microcirculation, l'hématocrite efficace est d'environ 20% puisque les globules rouges voyagent plus vite que le plasma (Fahraeus 1958). On remarque aussi que la viscosité apparente du sang dans la microcirculation diminue progressivement avec la ramification des vaisseaux puisque l'hématocrite diminue (Popel and Johnson. 2005). La couche pauvre agit comme un lubrifiant dans les micro-vaisseaux favorisant ainsi l'écoulement sanguin.

1.1.4 L'hémoglobinopathie ciblée par cette étude

Les hémoglobinopathies sont des maladies qui affectent l'hémoglobine contenue dans les globules rouges. Les outils permettant de calculer la vitesse des globules rouges seront éventuellement utilisés pour caractériser les désordres rhéologiques chez des souris atteintes de la bêta-thalassémie. Cette pathologie diminue la quantité de β -globine dans les globules rouges et crée un déséquilibre avec sa contrepartie l' α -globine. Les conséquences de ce déséquilibre sur les globules rouges affectés sont la surproduction de phosphatidylsérine, la rigidification et la destruction précoce par l'organisme (Stoyanova 2004). Le sang contient donc moins d'hémoglobine par litre et l'oxygénation n'est plus adéquate.

Les effets observables sur la microcirculation, principalement causés par la phosphatidylsérine, sont l'hypercoagulation du sang dénaturé, l'adhérence des globules rouges aux cellules endothéliales et l'occlusion vasculaire pouvant mener à l'hypoxie des tissus irrigués par les vaisseaux bloqués (Damiano 2004).

1.2 La microscopie

Les débuts de la microscopie remontent en 1590 avec les frères Janssen qui construisirent le premier microscope optique (Carris 2006). Presque cent ans plus tard, Giovanni Battista Amici innove en plongeant l'objectif dans l'eau. Les images sont plus lumineuses et plus nettes. Mais la grande révolution viendra avec Carl Zeiss, Otto Schott et Ernst Abbe vers 1872. Ensemble, ils vont reprendre les travaux de Amici et proposer de nombreuses améliorations. Zeiss, maître de l'instrumentation, fera du microscope un outil de précision (Zeiss 2006). Schott, chimiste de formation, propose les objectifs apochromatiques qui corrigent la déformation due aux différentes longueurs d'onde de la lumière. Abbe, professeur de physique, découvre que la résolution maximum est proportionnelle à la longueur d'onde divisée par deux fois l'ouverture numérique de l'objectif.

1.2.1 La résolution

La résolution est définie comme étant la plus petite distance pouvant être perçue entre deux points. L'équation 1.2.1 nous permet de calculer la résolution d en connaissant la longueur d'onde λ de la lumière (moy. 0,6 μm) ainsi que l'ouverture NA de l'objectif. Ce qui donne 0,375 μm pour un objectif de 40X avec une ouverture numérique de 0,8. Grâce aux objectifs 10X, 20X, 40X et 63X, il est possible d'observer aussi bien les artérioles que les globules rouges.

$$d = \lambda / 2 * NA \quad (1.2.1)$$

De nos jours, la technologie employée dans les microscopes électroniques à balayage à effet de champ permet de repousser les limites du visible jusqu'à une résolution de 0,2 nanomètre. Le microscope optique, lui, a peu changé et permet de différencier des

détails aussi petits que 0,2 micromètre, soit 35 fois plus petit que le diamètre d'un globule rouge (Delepine 2000).

1.2.2 La profondeur de champ

La notion de profondeur de champ quantifie la netteté de l'image en terme de résolution maximale. La profondeur de champ est la région de la scène située au dessus et au dessous du plan focal où la perception du spécimen est nette. Elle dépend de l'objectif utilisé, de la longueur d'onde et du grossissement total. En général, plus l'objectif a un fort grossissement, plus sa profondeur de champ sera réduite. Pour notre application c'est un avantage, puisque cela signifie que les globules rouges qui circulent à l'extérieur de cette région interviennent peu dans la formation de l'image. L'équation 1.2.2 permet de calculer la profondeur de champ pour tous les objectifs du microscope :

$$profondeur_de_champ = \frac{1000}{7 * NA * M} + \frac{\lambda}{2 * NA^2} \quad (1.2.2)$$

où M est le grossissement du sujet, NA est l'ouverture de l'objectif utilisé et λ la longueur d'onde de la lumière. Par exemple, pour un objectif de 40X et un NA de 0.8, la profondeur de champ est de 0,44 μm .

1.2.3 La profondeur de corrélation

Les phénomènes microscopiques sont maintenant filmés par des caméras et traités par des ordinateurs. Cette révolution a entraîné la découverte de nouvelles lois optiques qui expliquent l'influence de la formation de l'image sur les calculs effectués par ordinateur. La profondeur de corrélation (PC) est une notion introduite par Werely et al. dans les années 2000 (Meinhart 2000). Elle se définit comme la distance minimale qui sépare une

particule du plan image sans affecter le calcul de l'ordinateur. La profondeur de corrélation est beaucoup plus grande que la profondeur de champ puisque ici même les particules floues influencent les calculs. Elle est proportionnelle au diamètre des particules et au grossissement du microscope. La formule 1.2.3 permet de calculer la profondeur de corrélation :

$$PC = \left[\frac{(1 - \sqrt{\varepsilon})}{\sqrt{\varepsilon}} \left(\frac{n^2}{NA^2} - 1 \right) \left(d_p^2 + \frac{1.49(M+1)^2 \lambda^2}{M^2 NA^2} \right) \right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.2.3)$$

où d_p correspond au diamètre des particules, λ à la longueur d'onde moyenne de la lumière soit $0,6 \mu\text{m}$ et n est l'index de réfraction du médium utilisé pour la formation de l'image soit l'eau ($n = 1,33$). La variable ε représente l'intensité lumineuse minimum requise pour affecter les calculs par rapport à l'intensité de la particule au foyer. La valeur de cette variable a été fixée empiriquement à 10%.

Le tableau 1 donne un aperçu de la profondeur de corrélation théorique pour les différents objectifs qui équipent le microscope en fonction du diamètre des particules. On remarque que pour un globule rouge, $d_p = 7 \mu\text{m}$, observé avec un objectif de $M = 40X$ et $NA = 0,8$, l'équation 1.2.3 donne une profondeur de corrélation de $27,58 \mu\text{m}$. Ce résultat représente une très grande portion du diamètre des microvaisseaux. Cela signifie que pour un vaisseau de $30 \mu\text{m}$ de diamètre, presque la totalité des globules du flux sanguin influence la formation de l'image. Par conséquent les calculs de vitesses ne représentent plus seulement la vitesse des globules rouges dans le plan focal, mais bien la moyenne des vitesses des globules rouges dans l'axe optique.

Tableau 1

Aperçu de la profondeur de corrélation théorique pour les différents objectifs du microscope et différentes tailles de particules.

Diamètre des particules Dp (µm)	Profondeur de corrélation en fonction des caractéristiques des objectifs du microscope		
	M = 63 X N.A. = 0,95 N = 1,33	M = 40 X N.A. = 0,80 N = 1,33	M = 20 X N.A. = 0,50 N = 1,33
5	14,58 µm	19,87 µm	37,92 µm
7	20,29 µm	27,58 µm	51,95 µm
8	23,16 µm	31,46 µm	59,05 µm

1.2.4 La caméra vidéo

Les images du microscope sont enregistrées par une caméra vidéo numérique pour ensuite être traitées par ordinateur. Les caméras vidéo numériques permettent de sauvegarder directement les séquences d'images dans l'ordinateur. La fréquence d'échantillonnage de ces caméras est programmable et varie généralement en fonction de la taille des images enregistrées (Dalsa 2007).

Le nombre d'images par seconde que doit enregistrer la caméra dépend de la vitesse du phénomène étudié. La technologie des caméras analogiques permettait seulement d'enregistrer 60 images par seconde. Les phénomènes lents comme les globules blancs qui roulent sur la paroi des vaisseaux pouvaient alors être étudiés. La technologie des caméras numériques permet maintenant d'enregistrer des milliers d'images à la seconde. Il est donc désormais possible d'étudier des phénomènes plus rapides tels que la vitesse des globules rouges dans la microcirculation.

Deux types de technologies existent pour construire les photodiodes qui convertissent la lumière en information numérique soit les *charge coupled device* (CCD) ou les *complementary metal oxide semiconductor* (CMOS) (Dalsa 2007). La principale différence réside dans le fait que les CCD utilisent un seul convertisseur numérique pour tous les pixels alors que les CMOS ont autant de convertisseurs numériques que de pixels. Ceci rend les CMOS beaucoup plus rapides, car la conversion se fait simultanément pour toute l'image. Cependant, chaque convertisseur ne peut avoir le même gain donc pour une même quantité de lumière les pixels auront des valeurs un peu différentes. La caméra retenue pour enregistrer les images de microscopie dans cette étude est de type CMOS. Elle a été choisie pour sa rapidité en dépit du bruit de fond inhérent à cette technologie.

1.3 La microscopie intravitale

La microscopie intravitale consiste à observer, par l'entremise d'un microscope, des phénomènes ayant cours dans un organisme vivant, ici une souris. La méthode la plus simple consiste à opérer la souris et à extérioriser un organe afin de pouvoir l'imager. L'organe est plongé dans une solution saline et immobilisé par des points de suture (Bishop, Popel et al. 2001). D'autres groupes de recherche ont opté pour l'implantation d'une fenêtre de visualisation. Ce dispositif permet de garder le cobaye en vie plusieurs jours et d'observer l'évolution de pathologies tel le cancer (Patumraj, Yoysungnoen et al. 2005). D'autres encore ont utilisé une fibre optique pour éclairer de l'intérieur le cerveau d'un chat (Yamakawa 1987). Cette étude menée en 1987 évaluait les blocages que les globules blancs occasionnent dans les micro vaisseaux.

Lorsque appliquée à la circulation sanguine, les images de microscopie intravitale contiennent plusieurs artéfacts qui peuvent influencer les calculs de vitesse. Cinq catégories d'artéfacts viennent diminuer la qualité des images, soit les mouvements

physiologiques, la dilatation et la contraction des vaisseaux, la superposition de vaisseaux dans l'organe, la diffusion de la lumière et le bruit de la caméra.

1.3.1 Les mouvements physiologiques

Les mouvements physiologiques comme la respiration et les battements cardiaques sont cycliques et facilement détectables. Lorsque la souris respire, l'organe imagé bouge de haut en bas et la mise au point du microscope se fait en retrait du vaisseau d'intérêt. Il importe alors de bien fixer l'organe sur la platine du microscope pour réduire le flou dû à la respiration. Dans ce cas, Koutsiaris et al. proposent de rejeter les séquences où les mouvements physiologiques créent des images floues. (Koutsiaris and Pogiati 2004). La respiration déplace aussi les vaisseaux dans le plan image. Sugii et al. soustraient le mouvement physiologique dans le plan image avant de calculer la vitesse des globules rouges (Sugii, Nishio et al. 2002). Cette méthode permet d'obtenir des séquences vidéo où les vaisseaux ne bougent pas. Ainsi, les vecteurs vitesses calculés sur ces images représentent seulement la vitesse des globules rouges et non la somme des vitesses des globules et des mouvements physiologiques.

1.3.2 La dilatation et la contraction des vaisseaux

La dilatation et la contraction des vaisseaux peuvent changer le flux sanguin au cours d'une mesure. Sugii et al. ont observé des variations de diamètre de l'ordre de $0,027\ \mu\text{m}$ (typique) dans des vaisseaux de $20\ \mu\text{m}$ de diamètre (Sugii, Nishio et al. 2002). Ils estiment que ces variations sont négligeables en regard de la résolution du microscope et n'influencent pas le calcul des vitesses.

1.3.3 La superposition de structures

La superposition apparaît lorsque plusieurs vaisseaux se chevauchent dans l'organe imagé. Les vaisseaux situés plus haut ou plus bas que le plan focal sont hors champ, mais forment des traces d'ombres sur le plan image comme les lignes diagonales dans la figure 5 A et 5 B.

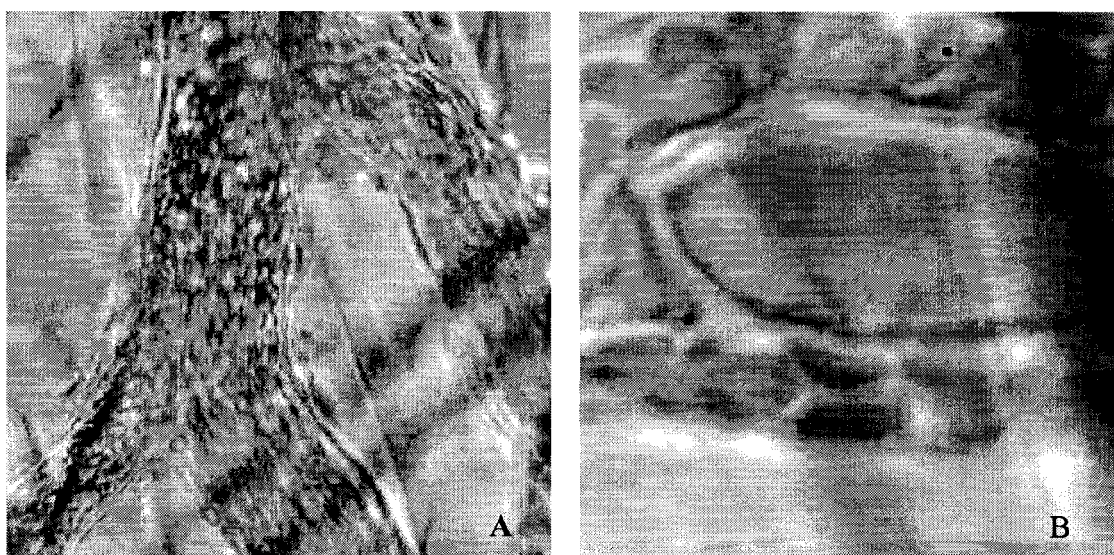


Figure 5 Images de microscopie intravitale avec des artefacts de superposition.
 A) Avec un faible grossissement (20X) on aperçoit un vaisseau dont le diamètre est d'environ 120 μm . B) avec un fort grossissement (100X) on peut distinguer les globules rouges dans les capillaires de 10 μm de diamètre.

Le mouvement des globules rouges qui circulent dans les vaisseaux hors champ va s'ajouter aux mouvements des globules dans le vaisseau d'intérêt et changer localement le module et l'angle des vitesses calculées. Pour minimiser ce problème, le choix de l'organe est crucial. Comme le mésentère et le crémaster sont des organes plats offrant peu de structures tridimensionnelles, ils sont souvent utilisés en microscopie intravitale (Popel and Johnson. 2005). La figure 6 est une photographie d'un crémaster de rat perfusé avec du carbone pour montrer l'angioarchitecture.

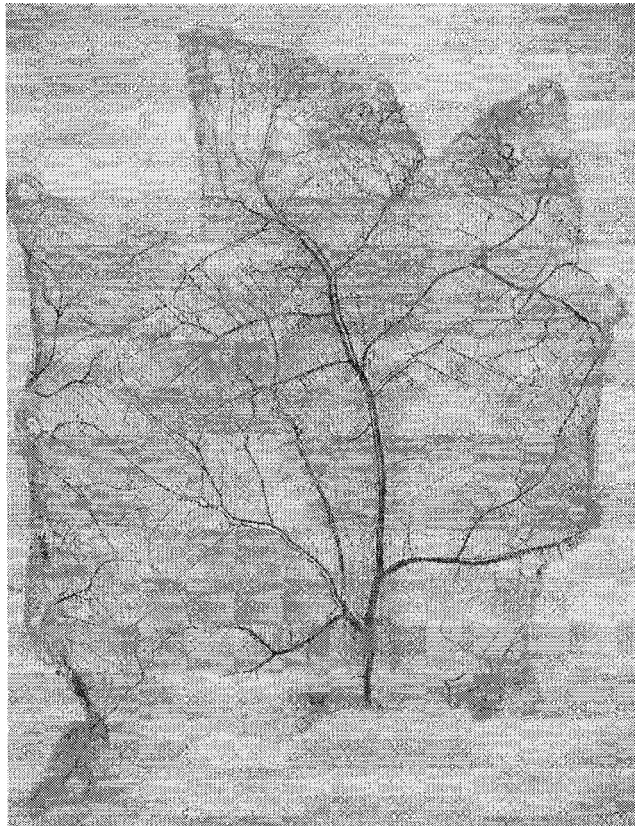


Figure 6 Image d'un crémaster de rat perfusé avec du carbone pour bien voir la micro angioarchitecture (Fung 1993).

1.3.4 La diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière sur les globules rouges entre dans le processus de création de l'image. La diffusion est créée par les différences d'index de réfraction entre le plasma sanguin et l'enveloppe des globules rouges. Elle varie aussi en fonction du niveau d'agrégation et du taux d'hématocrite du sang. On peut poser l'hypothèse qu'elle est constante pour une même observation puisque ces phénomènes varient lentement par rapport à la vitesse d'échantillonnage des images, soit typiquement de 2 000 images par seconde pour cette étude.

1.3.5 Le bruit de la caméra

Le bruit de la caméra CMOS influence aussi le calcul des vitesses. Puisque tous les convertisseurs ont une sensibilité différente, ils produiront une intensité lumineuse différente en dépit d'un éclairage homogène. Une image statique et faiblement bruitée se superpose alors sur l'image d'intérêt (Wereley and Meinhart 2005). Si l'image d'intérêt ne contient pas suffisamment de contraste, l'information pourrait être camouflée par le bruit et rendre le calcul des vitesses erroné. La section suivante montre comment la vitesse des particules est calculée.

1.4 Le calcul de la vitesse des particules

La méthode de la vélocimétrie par image de particule (PIV) calcule le déplacement des particules entre deux images d'une séquence et le divise par le temps qui sépare les images pour obtenir les vitesses de déplacements. Généralement, le temps entre les images est constant et connu pour une même séquence d'images.

La PIV est fréquemment utilisée dans l'étude des fluides. Cette technique utilise un faisceau laser en forme de feuille de l'ordre de 1 000 μm d'épaisseur pour éclairer un fluideensemencé de particules en mouvement, par exemple de la fumée de cigarette. Ce type d'éclairage permet de créer des images où les particules visibles appartiennent toutes au même plan. Les images recueillies sont composées de centaines de particules de la taille de quelques pixels. Ces images permettent de calculer avec précision les vitesses en deux dimensions pour des phénomènes macroscopiques. Koutsiaris et al. ont créé la μPIV en adaptant la technique à la microscopie (Koutsiaris, Mathioulakis et al. 1999).

La μPIV est utilisée pour étudier des phénomènes à une échelle microscopique tel l'écoulement sanguin dans les artérioles. Pour faire de la μPIV , il faut poser l'hypothèse

que la profondeur de corrélation est suffisamment petite pour que les particules qui se trouvent en retrait du plan image n'influencent pas le calcul des vitesses. L'éclairage par feuille laser à deux dimensions peut donc être remplacé par un éclairage ambiant tridimensionnel plus approprié à la microscopie. Par exemple, pour un objectif de 40X et des particules de $1\text{ }\mu\text{m}$, la formule 1.2.3 nous donne une profondeur de corrélation de $8,6\text{ }\mu\text{m}$. Ceci signifie que les vitesses calculées représenteraient les vitesses moyennes des particules présentes dans une section du fluide épaisse de $8,6\text{ }\mu\text{m}$.

La plupart des études de μPIV utilisent des particules ayant un diamètre compris entre 200 nanomètres et 3 micromètres (Wereley and Meinhart 2005). La raison qui motive ce choix est simple : plus les particules sont petites, plus la profondeur de corrélation diminue et par conséquent plus on se rapproche de l'hypothèse de départ. Le seul avantage que l'on trouve à utiliser de grosses particules est la réduction du mouvement brownien (Einstein 1905).

Barron et al. font état de plusieurs algorithmes utilisés pour le calcul des vitesses en PIV (Barron, Fleet et al. 1994). Beaucoup de travaux s'inspirent de la théorie du flux optique de Schunck et Horn développée en 1981 (Schunck and Horn 1981). La théorie se base sur le théorème de conservation de la masse pour poser ses hypothèses. Les méthodes contemporaines sont des adaptations pour des problèmes particuliers. Voici les principales familles d'algorithmes et leur comportement en microscopie intravitale.

1.4.1 La corrélation croisée

La corrélation croisée est la première méthode à laquelle on pense lorsque l'on parle de mesure de déplacement. Cette méthode est utilisée pour sa précision, sa robustesse et sa simplicité (Cheezum, Walker et al. 2001). Elle nécessite l'hypothèse que l'intensité lumineuse des particules ne change pas entre deux images consécutives. Elle est basée sur une évaluation de la ressemblance entre l'étampe, un noyau prélevé dans l'image de

départ, et la fenêtre, une région de l'image d'arrivée (Tsukada, Minamitani et al. 1996). Autrement dit, on cherche dans la fenêtre la région qui ressemble le plus à l'étampe. Cette région de la fenêtre nous donnera la position d'arrivée. La position de départ est connue comme étant la position à laquelle le centre de l'étampe a été prélevé. Il ne reste qu'à soustraire ces deux positions pour trouver le déplacement.

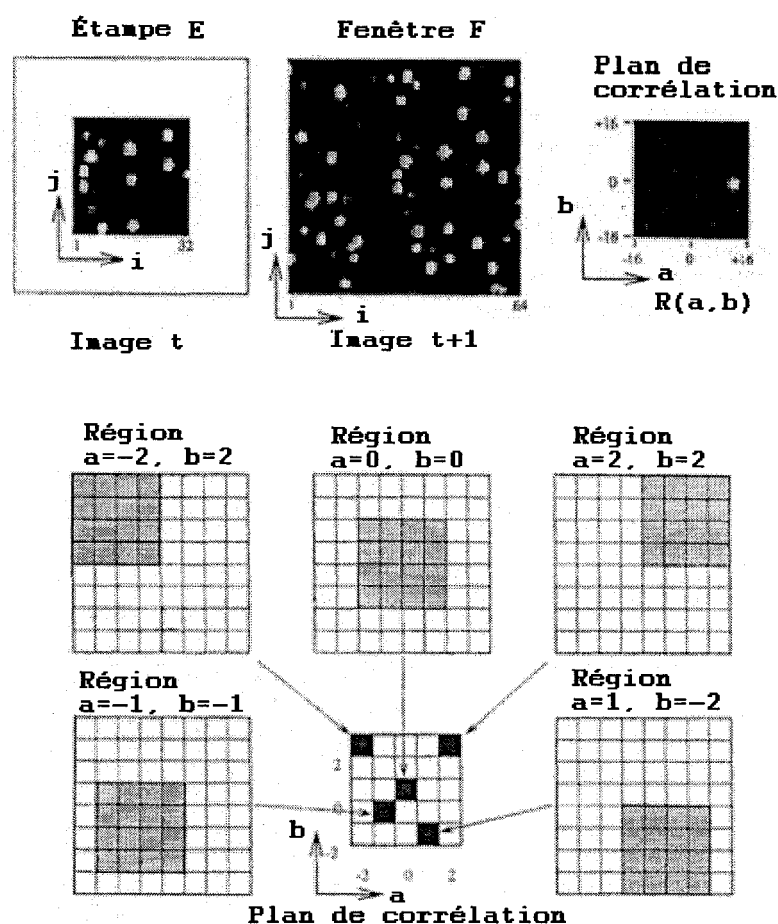


Figure 7 Images typiques de μ PIV et méthode de calcul du plan de corrélation. Les deux images, t et $t+1$, sont utilisées pour composer l'étampe et la fenêtre de corrélation, en haut. Le plan de corrélation est un assemblage de plusieurs corrélations entre l'étampe et les régions de la fenêtre.

La ressemblance, R , entre l'étampe et la fenêtre est mesurée par la convolution de l'étampe, E , par une région de la fenêtre, $F(a, b)$, voir figure 7. La convolution consiste,

en traitement d'image, à multiplier la valeur numérique des pixels de l'étampe par la valeur numérique des pixels occupant la même position dans la région de la fenêtre et à additionner tous ces produits, voir l'équation 1.4.1. Dans cette formule, a et b représentent les coordonnées dans le plan de convolution et i et j les coordonnées dans l'étampe et dans la fenêtre. La variable N correspond au nombre de pixels dans l'étampe et sert à normaliser le résultat de la corrélation. Cette méthode peut aussi être implémentée en utilisant le déphasage 2D de la Transformée de Fourier Rapide pour accélérer le calcul lorsque la fenêtre est grande.

$$R(a,b) = \frac{1}{N^2} \sum_{i=0}^{N-1} \sum_{j=0}^{N-1} E(i,j)F(i+a,j+b) \quad (1.4.1)$$

La première étape de la corrélation croisée consiste à générer autant de régions qu'il y a de pixel dans la fenêtre. Ces régions doivent avoir les mêmes dimensions que l'étampe. Les régions qui correspondent aux pixels en bordure de la fenêtre seront remplies avec des valeurs nulles afin de conserver les bonnes dimensions. Ensuite l'étampe (figure 8B) est convoluée avec chaque région de la fenêtre (figure 8A) pour obtenir le plan de corrélation (figure 8C) ayant les mêmes dimensions que la fenêtre. Troisièmement, les valeurs de la carte des ressemblances sont normalisées (figure 8D) pour ne pas favoriser les pixels ayant une grande valeur numérique (Haralick and Shapiro 1993). Quatrièmement, le maximum du plan de corrélation est recherché pour connaître la position d'arrivée. Finalement, l'interpolation de la position du maximum, à l'aide d'une gaussienne 2D, permet d'augmenter la précision du déplacement calculé jusqu'au dixième de pixel. L'interpolation du maximum est une méthode répandue bien qu'elle ait tendance à se verrouiller sur les valeurs entières (Cowen and Sveen 2003). Ce verrouillage est causé par la numérisation de l'image. La bande passante n'étant pas infinie, les déplacements interpolés auront plutôt une précision d'un demi pixel. Il ne reste qu'à soustraire la position de départ de la position d'arrivée pour obtenir le

déplacement. Pour calculer la vitesse des particules on divise le déplacement par le temps entre les deux images.

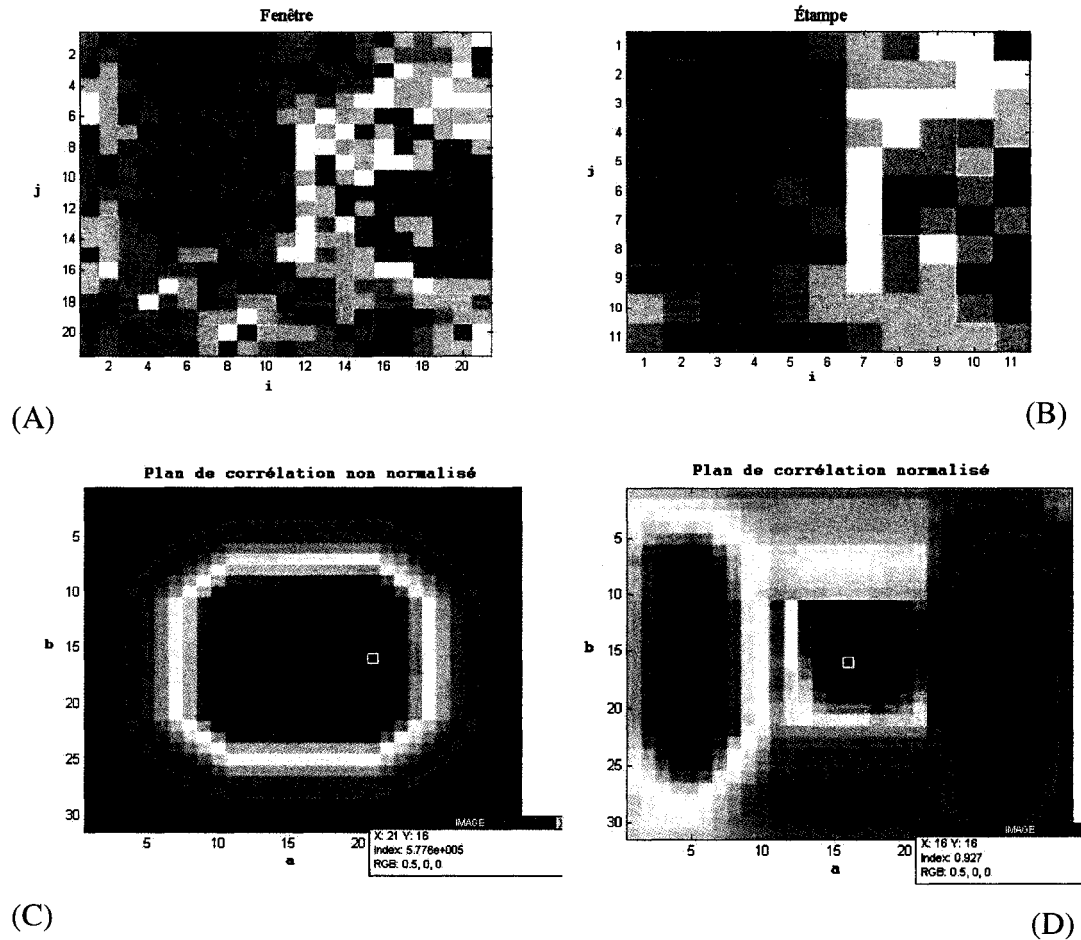


Figure 8 Fenêtre (A), étampe (B), et plan de corrélation non normalisée (C) et normalisée (D). Les images proviennent de vidéo de microscopie intravitale, les pixels sont présentés en fausses couleurs. Le maximum de la corrélation est représenté par le petit carré noir en C et D. On peut constater qu'une fois normalisé le maximum de corrélation est au centre, ce qui donne un déplacement nul alors qu'avant la normalisation le maximum se situait à 5 pixels du centre dans l'axe des X.

L'avantage de la corrélation croisée est qu'elle peut être utilisée sur des images présentant des taches en mouvement. Autrement dit, elle fonctionne même lorsque l'on ne distingue pas les particules les unes des autres (Tsukada, Minamitani et al. 2000). Elle

permet aussi de calculer les déplacements dans toutes les orientations de l'image sans modifier l'algorithme.

Une limitation importante de la corrélation croisée est qu'elle ne peut pas mesurer de rotation. Les résultats représentent donc seulement des translations. Une autre limitation est la fiabilité des résultats. Parmi les vecteurs calculés se trouvent des vecteurs aberrants qui devront être filtrés par un traitement postérieur. Plusieurs filtres, basés sur la continuité spatiale, sur la variance temporelle ou encore sur le coefficient de corrélation, sont utilisés pour éliminer ces vecteurs (Cowen and Sveen 2003).

1.4.2 Le suivi de particules

Lorsqu'il est sujet de suivi de particules, le problème à résoudre est différent. La position de l'objet doit être détectée dans chacune des deux images de façon indépendante. Cependant, la position de l'objet dans la première image peut servir de connaissance *a priori* pour trouver la position dans l'image suivante. Le déplacement est calculé en prenant pour hypothèse que l'objet détecté dans les deux images est le même. Cette technique, utilisée conjointement avec un calcul de centre de masse, donne de bons résultats pour les images à fort grossissement tel qu'à la figure 5B (Cheezum, Walker et al. 2001). De plus, la détection des centres de masse est un bon outil pour palier aux déformations et aux rotations des globules rouges qui sont visibles à cette échelle.

Le suivi de particules pose cependant un autre problème plus complexe, soit la segmentation des particules. Ici encore, de nombreuses méthodes s'offrent à nous pour trouver les contours. Les *snakes* ou les *level set*, pour ne nommer qu'eux, sont des outils récents qui pourraient être utilisés (Xu and Prince 1998; Sethian 2001). Pour simplifier la segmentation et renforcer l'hypothèse de départ, la méthode du suivi de particules doit être utilisée sur des flux contenant peu de globules rouges. Le comportement des quelques particules imagées est considéré comme étant représentatif du comportement

général. Plusieurs couples d'images sont alors nécessaires pour obtenir les déplacements sur toute la surface d'intérêt.

Le suivi de particules donne de bons résultats sur des images de microscopie par fluorescence. Ce mode d'imagerie permet de voir seulement les globules spécifiquement marqués avec un produit qui émet seulement à une longueur d'onde (par exemple le vert). L'image ne contient alors que les quelques globules marqués malgré l'utilisation de sang à un taux d'hématocrite normal (Sugii, Okuda et al. 2005).

1.4.3 Le gradient d'intensité temporelle

Lucas et Kanade (1981) ont proposé une première implémentation du flux optique dans les années mille neuf cent quatre-vingt. Cette méthode utilise le gradient de l'intensité lumineuse des pixels dans le temps. Pour créer un système surdéterminé, une contrainte est ajoutée. Cette contrainte veut que le flux soit aussi constant dans l'espace pour une petite région d'intérêt. L'équation 1.4.3 représente le système d'équations à résoudre pour obtenir les vecteurs vitesses (V_x , V_y), où I_{x1} , I_{y1} et I_{t1} représentent la dérivée partielle en x , en y et dans le temps du pixel 1 de la région d'intérêt. Le paramètre n représente le nombre de pixels compris dans la région d'intérêt utilisée. L'ordre des équations n'a pas d'importance dans le système surdéterminé (Lucas and Kanade 1981).

$$\begin{bmatrix} I_{x1} & I_{y1} \\ I_{x2} & I_{y2} \\ \vdots & \vdots \\ I_{xn} & I_{yn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} V_x \\ V_y \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -I_{t1} \\ -I_{t2} \\ \vdots \\ -I_{tn} \end{bmatrix} \quad (1.4.3)$$

Cette méthode est réputée pour être robuste au bruit, mais donne de meilleurs résultats sur des images structurées, par exemple une image où les globules rouges sont facilement distinguables. Dans le cas des images de micro circulation sanguine, les

taches se forment et se transforment d'une image à l'autre malgré la grande fréquence d'échantillonnage. La distribution aléatoire des taches dans les images à l'étude diminue grandement la précision de cette méthode.

1.5 Les méthodes de validation

Toutes les études en traitement d'images sont confrontées au même problème de validation des résultats. On trouve dans la littérature scientifique plusieurs méthodes utilisées pour connaître la précision et la robustesse des algorithmes. Certains ont utilisé des modèles *in vitro*, d'autres des images de synthèse. Des modèles théoriques s'ajoutent souvent aux images pour simuler le bruit caractéristique. Aucun modèle n'est parfait, mais voici les avantages qu'on peut tirer de chacun d'eux.

1.5.1 Les modèles *in vitro*

L'équipe de Koutsouris fait l'usage d'un modèle *in vitro* pour étudier la microrhéologie (Koutsouris, Guillet et al. 1989). À l'aide d'électrodes, ils ont mesuré la conductance du sang et déduit le temps que prennent les globules rouges à traverser le filtre. Koutsouris et al. calculent les profils de vitesses dans des capillaires de 300 μm (Koutsouris, Mathioulakis et al. 1999) par μPIV . Depuis quelques années, la technologie des MEMS a beaucoup facilité la création de modèles *in vitro*. Les modèles *in vitro* trouvent alors plusieurs utilités et leur forme varie beaucoup. Ils ont été utilisés pour évaluer l'effet qu'ont les particules hors champ sur le calcul des vitesses (Olsen and Adrian 2000).

La figure 9A montre les vecteurs vitesses calculés le long d'une droite perpendiculaire à la paroi du vaisseau sanguin lors d'une expérimentation intravitale. Le profil de vitesses correspond à l'enveloppe de ces vecteurs, Dans cette image *in vivo* la courbure du vaisseau crée un profil de vitesses asymétrique. Les globules rouges vont donc plus vite à l'intérieur de la courbe, partie de droite.

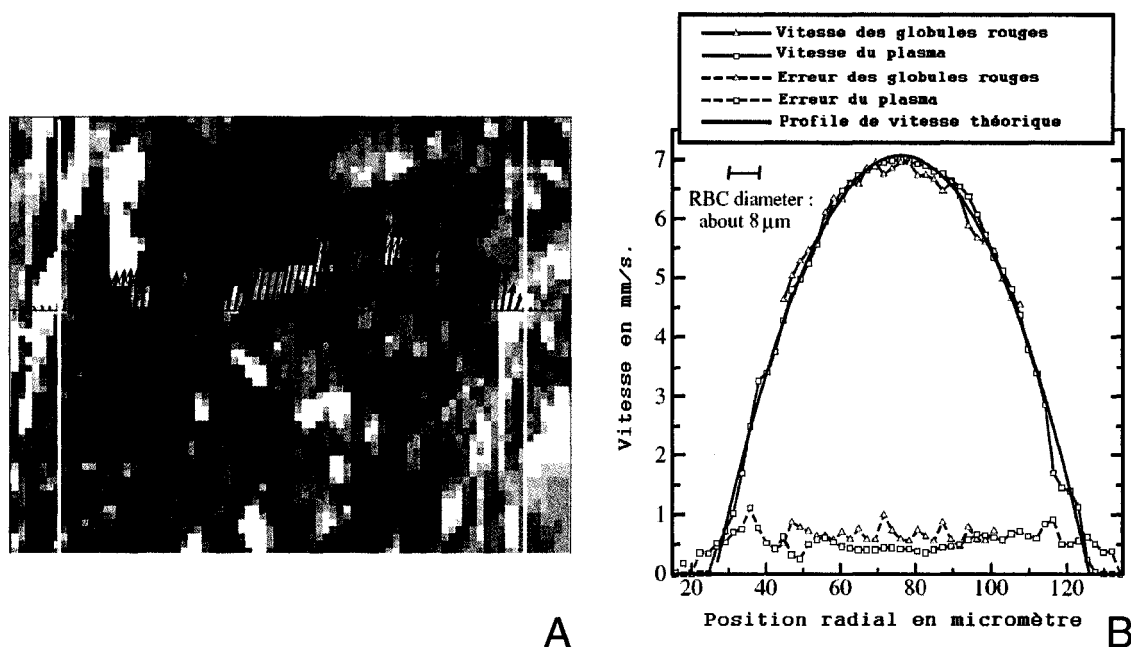


Figure 9 A) Vecteurs vitesses calculés sur une image *in vivo* d'une souris normale (résultats préliminaires). La dimension des vecteurs a été ajustée pour montrer l'enveloppe qui forme le profil de vitesses. Les traits jaunes représentent les parois du vaisseau. B) Profils de vitesses du sang et du plasma dans un micro tube circulaire. Résultats obtenus par la méthode de vélocité par imagerie de particule. On remarque que pour un taux d'hématocrite de 21%, les globules rouges voyagent à la même vitesse et selon un profil identique à celui du plasma. Vitesse moyennée dans le temps (Sugii, Okuda et al. 2005).

Sugii et al. ont perfusé un tube de verre de 100 μm de diamètre avec du sang contenant des globules rouges et des particules fluorescentes de 1 μm de diamètre (Sugii, Okuda et al. 2005). Comme la longueur d'onde émise par les globules rouges et les particules n'est pas la même, cela leur a permis de calculer la vitesse des globules rouges et des micro billes de façon indépendante. Pour mesurer la vitesse du plasma, ils posent l'hypothèse que les microbilles, beaucoup plus petites que les globules rouges, vont à la même vitesse que le plasma. Ils comparent les profils de vitesses au profil théorique dans le tube afin de démontrer la précision de la méthode de calcul utilisée (Sugii,

Nishio et al. 2002; Sugii, Okuda et al. 2005). La vitesse des globules rouges calculés en μ PIV est utilisée pour établir les profils de vitesses le long d'une droite perpendiculaire à la paroi.

Les profils de vitesses décrivent la forme du flux qui est en quelque sorte la signature du type d'écoulement. La figure 9B montre que les vitesses des globules rouges (triangles) et des petites particules (carrés) sont semblables selon l'étude de Sugii et al. (Sugii, Okuda et al. 2005). Un profil théorique répondant à un comportement de Poiseuille est tracé en noir dans cette figure. Les vitesses des globules rouges et du plasma superposées au profil théorique montrent une bonne correspondance entre les vitesses calculées et les vitesses théoriques. On remarque aussi que les globules rouges voyagent à la même vitesse et selon un profil identique à celui du plasma (représenté par les particules de 1 μ m) pour un hémotocrite non physiologique de 21%. Le nombre de Reynolds de la solution constituée de 21% de globules rouges, 0,4% de micro billes et d'eau saline varie entre 1,2 et 3,5 $\times 10^{-2}$.

Shin et al. ont conçu un réseau de capillaires ayant des propriétés physiologiques qu'ils ont ensuite recouverts de cellules endothéliales (Shin, Matsuda et al. 2004). Leurs recherches portent sur des organes artificiels, mais la technologie pourrait aussi être utilisée en rhéologie. Par des méthodes de gravure sur verre, Shevkoplyas a fabriqué un réseau de capillaires où les angles sont droits, la profondeur des vaisseaux est de 5,4 μ m et la largeur varie entre 6 et 63 μ m. (figure 10) (Shevkoplyas 2002). Il est ainsi possible d'observer la déformation des globules rouges, des flux inverses et des obstructions passagères dans certaines branches du réseau.



Figure 10 **Modèle *in vitro* de Shevkoplyas (Shevkoplyas 2002).**

Ce sont les modèles *in vitro* qui produisent les images se rapprochant le plus de la réalité. Puisque le même microscope est utilisé *in vivo* et *in vitro*, les images présentent les mêmes caractéristiques, le même bruit. Leur fiabilité à reproduire des phénomènes physiologiques repose sur leur conception.

1.5.2 Les images de synthèse

Qu'elles soient faites à partir d'images réelles ou construites de toutes pièces, les images de synthèse sont très utilisées. Elles ont l'avantage d'être faciles à produire et peuvent contenir précisément les caractéristiques que l'on tente de déterminer. Par exemple, pour mesurer la précision d'un algorithme au dixième de pixel près, il est nécessaire de connaître la position des particules dans l'image de référence avec une précision encore plus grande. Lors de la construction d'une image de synthèse, les positions et les intensités de particule sont connues.

Cheezum et al. ont conçu des images de très grande précision pour tester leurs algorithmes (Cheezum, Walker et al. 2001). Pour cela, ils utilisent une fonction de transfert représentant le système optique et une image simple en noir et blanc. D'autres chercheurs ont utilisé la méthode de Monte-Carlo pour placer les particules dans leurs images (Sugii, Nishio et al. 2000). Tsukada et al. simulent les taches formées par la circulation sanguine par des pastilles ayant différents niveaux de gris. Ils déplacent ensuite les pastilles selon un profil théorique (Tsukada, Minamitani et al. 2000). La figure 11a expose les pastilles grises à l'arrêt tandis que la figure 11b expose les pastilles en mouvements. Toro et al. construisent leurs images synthétiques avec des sections d'images de microscopie intravitale (figure 11c) (Toro, Chayer et al. 2006). Ils segmentent manuellement la lumière du vaisseau provenant d'une image *in vivo* et lui

infligent un déplacement connu répondant à un flux laminaire. L'image est ensuite superposée à une image qui simule un fond de scène immobile.

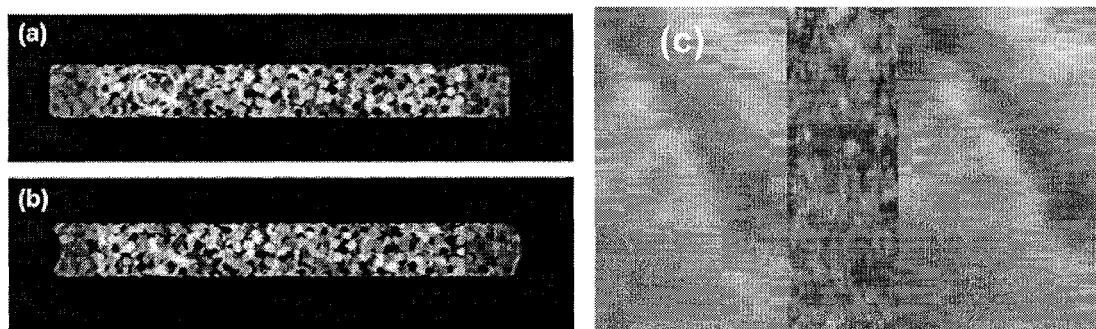


Figure 11 Images de synthèse. En a et b les images de Tsukada et al. à l'arrêt et en mouvement respectivement (Tsukada, Minamitani et al. 2000). En c une image de Toro et al. contenant une image d'écoulement *in vivo* entourée de bruit pour simuler le fond de scène (Toro, Chayer et al. 2006).

Les images synthétiques permettent de tester un paramètre à la fois, ce qui est difficile à réaliser avec un modèle *in vitro*. De plus, les déplacements compris dans les séquences d'images sont connus avec une grande précision ce qui n'est pas le cas pour les images provenant d'un modèle *in vitro*.

1.5.3 La modélisation informatique

Des modèles informatiques, régis par la mécanique des fluides et des solides, permettent de simuler le comportement du sang par ordinateur. Le flux sanguin micro circulatoire est décrit comme étant non Newtonien (Johnson, Bishop et al. 1999). Pour permettre l'analyse de ses différents comportements telle la viscosité, le sang est souvent modélisé comme des particules solides en suspension dans un liquide.

La plus connue des méthodes de modélisation informatique est l'analyse par éléments finis. Premièrement, cette analyse discrétise l'espace en un nombre fini d'éléments plus ou moins rapprochés. Deuxièmement, les forces locales et globales qui s'appliquent sur chaque élément du modèle sont calculées en fonction de la position relative des autres éléments. Troisièmement, les forces obtenues sont utilisées pour calculer le déplacement et les nouvelles positions de chaque élément. L'ordinateur recommence les étapes deux et trois jusqu'à ce que le nombre d'itérations soit suffisant pour observer les phénomènes décrits par le modèle (Liu, Zhang et al. 2004; Bagchi, Johnson et al. 2005). Pour obtenir des résultats de bonne précision, il faut utiliser plusieurs éléments très rapprochés, ce qui se traduit en pratique par un temps de calcul très long ou la simulation d'un tout petit volume.

Les modèles informatiques permettent de simuler les différentes propriétés de l'écoulement tel l'agrégation des globules rouges (Chen and Huang 1996; Lim, Bascom et al. 1997; Fontaine, Savéry et al. 2002). Cependant, ils sont difficiles à valider et leur aptitude à reproduire des comportements réalistes nécessite l'emploi de modèles souvent très complexes (Boryczko, Dzwinel et al. 2003; Dzwinel, Boryczko et al. 2003). Ces simulations ont les aptitudes nécessaires pour étudier des propriétés spécifiques du sang tel la déformation des globules rouges, mais nécessite beaucoup de temps de calcul.

Fenech et al. ont modélisé le déplacement des globules rouges en adaptant les travaux de Helbing et al. sur les forces en présence lors de panique humaine dans une foule (Helbing, Farkas et al. 2000; Fenech, Garcia et al. (soumis)). Pour rendre la simulation plus réaliste, ils ont ajouté des forces d'agrégation et infligé un profil de vitesses parabolique aux pastilles qui représentent les globules rouges. Puisque les positions des éléments sont connues, les simulations informatiques peuvent aussi servir à fabriquer des images de synthèse. La figure 12 montre les pastilles dans un écoulement 2D pour

une petite force d'agrégation. Cette méthode n'est pas encore validée, mais si elle s'avérait réaliste, le temps de calcul nécessaire serait bien moins grand que pour une simulation par éléments finis.

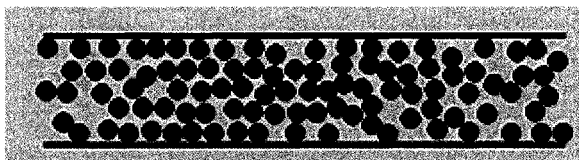


Figure 12 Image provenant d'une simulation informatique suivant un modèle de panique.

1.6 Synthèse et objectifs

La revue de littérature fait ressortir la diversité des technologies nécessaires à l'étude de la microcirculation sanguine. Parmi les algorithmes qui ont été recensés, la corrélation croisée semble la plus appropriée à notre application. Les dimensions de la fenêtre et de l'étampe, la sensibilité au bruit et à la profondeur de champ, sont autant de phénomènes qui altèrent la précision des calculs. Les méthodes de validation tels les images de synthèse et le modèle *in vitro* tenteront de reproduire les réalités physiologiques de l'écoulement sanguin. Il sera donc possible de confronter l'algorithme de corrélation croisée à des situations réalistes et de valider les vitesses calculées.

Hypothèses :

1. Le traitement des images de la microcirculation sanguine par ordinateur permet de mesurer les vitesses des globules rouges.
2. Un modèle *in vitro* permet de valider le processus de traitement des images en comparant le débit de la pompe aux débits estimés à partir des vitesses des globules calculées par l'algorithme.

Le premier objectif est de mettre au point un modèle *in vitro* de microcirculation sanguine permettant de contrôler le débit. Le second objectif est de concevoir un algorithme robuste pouvant calculer les vitesses de déplacement des globules rouges dans la microcirculation. Le troisième objectif est de définir la précision et les limitations de cet algorithme à l'aide du modèle *in vitro* et d'images de synthèse.

CHAPITRE 2

CONCEPTION DU MODÈLE *IN VITRO*

Travailler à une échelle microscopique n'est pas une simple tâche. Une minuscule différence de pression, un frottement dans la seringue, un caillot dans le sang, la qualité de l'eau où baigne l'objectif sont autant de phénomènes nuisibles qui seront amplifiés 40 fois par l'objectif du microscope.

Ce chapitre décrit les moyens qui ont été mis en œuvre pour réaliser un modèle réaliste de microcirculation *in vitro*. La méthode de création des images de synthèse utilisées pour étudier la profondeur de corrélation y sera aussi présentée.

2.1 Le modèle *in vitro*

La figure 13 présente un schéma du modèle *in vitro* et de ses composantes.

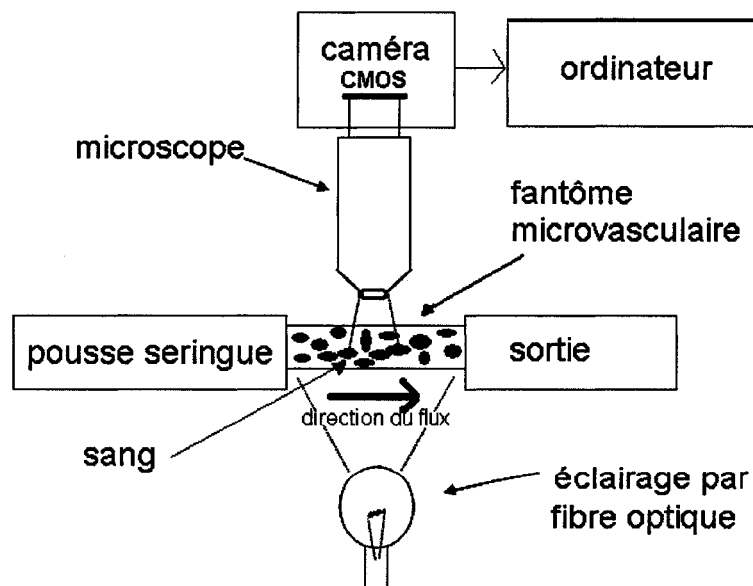


Figure 13 Schéma du modèle *in vitro* et de ses composantes.

Le modèle *in vitro* est composé d'un fantôme microvasculaire, d'une pompe de type pousse seringue et de sang humain (figure 14). Un microscope, un système d'éclairage à fibre optique et une caméra CMOS complètent le modèle pour l'enregistrement des images.

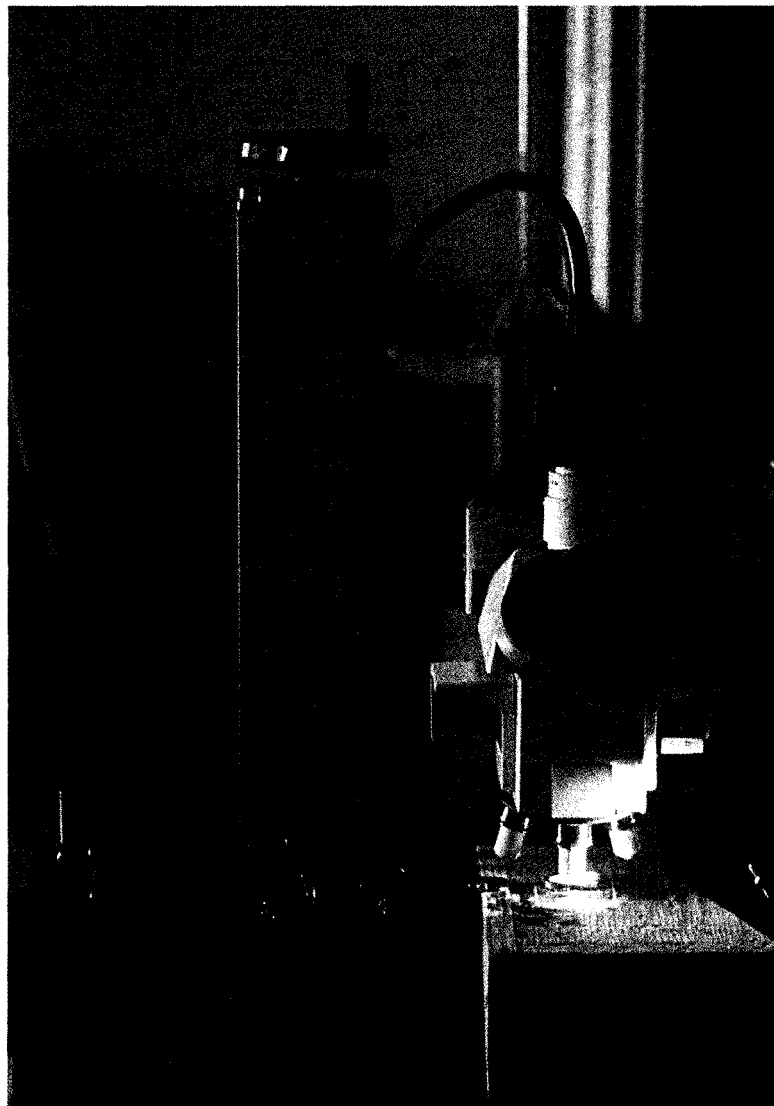


Figure 14 Vue d'ensemble du modèle *in vitro*.

Le modèle *in vitro* est ainsi construit pour répondre à deux grandes exigences, soit permettre l'utilisation du microscope pour produire des images similaires aux images intravitales et reproduire le plus fidèlement possible les conditions physiologiques d'un écoulement sanguin dans la microcirculation. Voici une description matérielle de chaque composante du modèle.

2.2 Le fantôme micro vasculaire

Le fantôme micro vasculaire a été créé à l'aide de micro tubes de verre communément utilisés en chromatologie (SGE 2006). Fabriqués par la compagnie SGE, les tubes retenus ont un diamètre interne de 30 μm et leur lumière est circulaire (numéro de produits 062801). Ils ont été choisis pour leur diamètre externe dix fois supérieur au diamètre interne. Cette propriété permet de minimiser les aberrations visuelles causées par la courbure extérieure du verre. Comme le rayon de courbure extérieur est grand, la surface du tube par où est observé le fluide circulant à l'intérieur est considérée comme plane.

La fabrication consiste à insérer de courtes sections de micro tubes dans des capillaires en vitre et à les fixer à l'aide de colle Epoxy (figure 15). Le mode de fabrication artisanal nous contraint d'utiliser au moins 8 mm de tube alors que physiologiquement ces vaisseaux ont une longueur moyenne de 0,7 mm. (Fung 1993). L'utilisation de micro tubes plus longs que les microvaisseaux de cette taille crée une résistance à l'écoulement plus grande et affecte la stabilité du modèle.

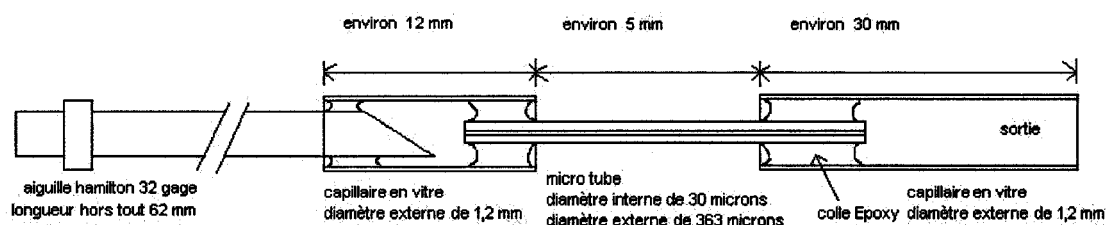


Figure 15 Schéma du modèle *in vitro* fabriqué artisanalement à l'aide de micro tubes de 30 µm de diamètre interne.

Pour éviter que les globules rouges sédimentent avant d'entrer dans le micro tube, il est nécessaire de réduire la distance entre le fantôme microvasculaire et la seringue (figures 15 et 16). Un grand espace mort, par exemple une section de tube, annulerait tous les efforts faits pour contrer la sédimentation des globules rouges. L'aiguille de la seringue a donc été fixée directement à une extrémité du fantôme vasculaire.

Lors de l'assemblage, des précautions sont prises pour ne pas obstruer les micro tubes avec la colle tout en conservant le plus petit espace mort possible. L'aiguille et les deux sections de pipette sont collées à leur tour sur une lame de microscope. Finalement, une paroi de silicone permet d'immerger le fantôme dans l'eau pour l'utilisation des objectifs à immersion du microscope.

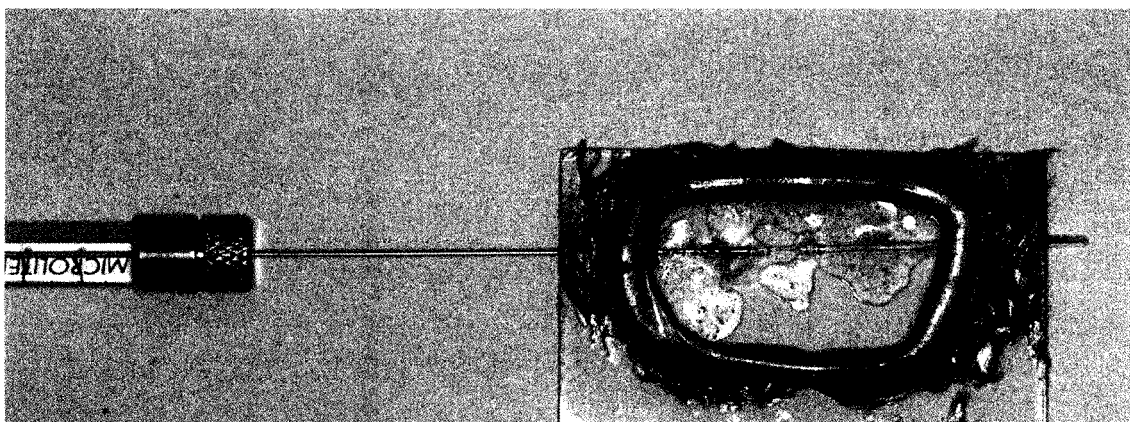


Figure 16 Photo de la seringue de 10 µL et du fantôme microvasculaire.

Le pousse seringue est déposé sur une plateforme en bois qui permet de maintenir le fantôme microvasculaire solidement fixé à la même hauteur que la seringue. Le fantôme n'est généralement utilisé que pour une seule expérience. Les images microscopiques sont prises au centre du microtube, la longueur d'entrée est, par conséquent, d'environ 4 mm.

2.3 Le sang

Du sang humain, provenant du surplus d'un autre protocole expérimental, est utilisé dans le modèle *in vitro*. Les prélèvements de sang ont été faits selon les règles du comité d'évaluation scientifique et d'éthique du centre de recherche du Centre hospitalier de l'université de Montréal. Pour empêcher la coagulation, l'infirmière a utilisé des tubes sous vide contenant de l'EDTA pour prélever le sang. Lors des expérimentations, le sang est traité de deux façons afin d'obtenir du sang lavé et du sang reconstitué. Pour obtenir du sang lavé, il faut d'abord centrifuger le sang trois fois pendant dix minutes à 3 600 rpm en changeant l'eau saline à chaque centrifugation. Ensuite, les globules rouges sont isolés puis mélangés à de la solution saline de façon à obtenir le taux d'hématocrite désiré. La solution saline permet de conserver la pression osmotique dans les globules rouges tout en modifiant les propriétés hémodynamiques du sang. Ainsi, le sang lavé ne s'agrége pas et se comporte comme un liquide Newtonien. Le sang est préparé la veille de l'expérience et entreposé à 4°C. Une heure avant les expériences, le sang est retiré du réfrigérateur pour lui permettre d'atteindre la température de la pièce, soit 20°C.

Les mêmes manipulations mènent à la fabrication du sang reconstitué, seulement ici le plasma est séparé des globules blancs et des plaquettes pour ensuite être mélangé aux globules rouges afin d'obtenir le taux d'hématocrite souhaité. Le sang obtenu a donc les mêmes caractéristiques que le sang qui circule dans nos vaisseaux sanguins et se comporte de façon non Newtonienne. Le nombre de Reynolds de la solution constituée de 45% de globules rouges et de plasma varie entre $5,4$ et $9,5 \times 10^{-2}$.

La seringue a été remplie avec du sang à cinq différents taux d'hématocrite soit 10%, 20%, 30%, 40% et 45%. Il s'avère qu'en dessous de 40% d'hématocrite (figure 17A), les images présentent de grandes régions sans globule, ce qui n'est pas représentatif des images *in vivo* (figure 17C) obtenues sur des veinules de calibre similaire. C'est à 45% d'hématocrite, (figure 17B), que les images ressemblent le plus aux images de microscopie intravitale.

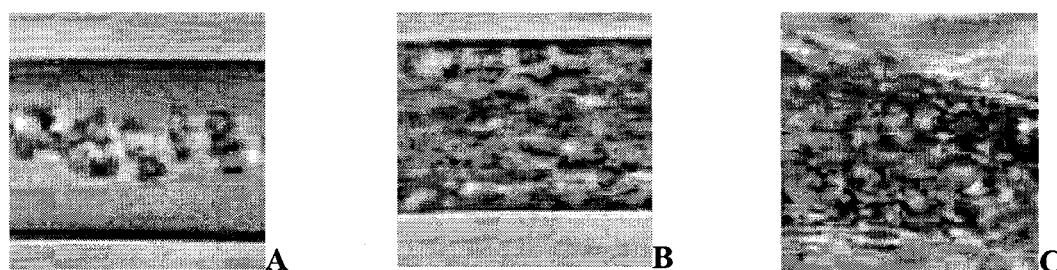


Figure 17 Images de microscopie *in vitro* et *in vivo*. De gauche à droite des images *in vitro* avec du sang à 22% (A) et 45% (B) d'hématocrite, et une image *in vivo* (C).

Lorsque le taux d'hématocrite du sang utilisé est plus bas que 40%, on remarque aussi que le taux d'hématocrite dans le tube n'est pas constant durant l'expérience. En effet, le taux d'hématocrite dans le tube et dans la seringue varie dans le temps et ne sont pas les mêmes dû à l'effet de Fahraeus (Fahraeus 1958).

Le taux d'hématocrite dans le tube a été mesuré de façon expérimentale. Un microtube de verre long de 20 mm a été perfusé avec une seringue contenant du sang lavé à 45% d'hématocrite durant 2 minutes à 15 $\mu\text{L/h}$, puis sectionné du reste du modèle *in vitro* et centrifugé pour établir les volumes de sang et de solution saline. Il s'avère que le taux d'hématocrite efficace dans le microtube était de 37%.

Le sang utilisé pour remplir les seringues durant les expériences a donc été ajusté à un hématocrite de 45% pour obtenir des images réalistes, ce qui correspond à une valeur

physiologique dans la circulation systémique. Il est à noter que le taux d'hématocrite efficace de 37% est cependant au-dessus du taux d'hématocrite normal dans des veinules de même taille, soit environ 18% (Fung 1993).

2.4 Le pousse seringue

Le pousse seringue (Harvard instruments PHD 2000) nous permet de perfuser le modèle avec un débit d'une grande précision. Dans le pousse seringue, un moteur pas à pas actionne un curseur qui à son tour pousse sur le piston de la seringue. Le débit de la pompe est donc proportionnel à la vitesse de déplacement du curseur multiplié par le diamètre interne de la seringue au carré. Lorsque la seringue est très petite, il est possible d'obtenir de très petits débits tel que 1 $\mu\text{L/h}$. Le fabricant garantit une erreur maximum de 1% sur le débit programmé.

Pendant les expérimentations, une attention particulière est portée sur le bon fonctionnement de la seringue. Cette pièce clef du modèle *in vitro* s'enraye facilement, mais demeure nécessaire pour garantir la précision du débit. Entre chaque acquisition, les images du flux sanguin sont affichées sur l'écran de l'ordinateur qui contrôle la caméra. Les blocages, bulles et autres problèmes reliés au modèle *in vitro* peuvent donc être diagnostiqués et notés sur le rapport d'expérience. Après chaque expérience, la seringue doit être nettoyée avec du peroxyde et de l'eau distillée, puis séchée.

La sédimentation des globules rouges dans la seringue tout au long de l'expérience présente un problème. La vitesse de sédimentation est inversement proportionnelle à la viscosité et à la densité du liquide suspendant (Ismailov, Shevchuk et al. 2005). Si la sédimentation est surtout constatée lors de l'utilisation du sang lavé, c'est que la densité et la viscosité de la solution saline sont plus petites que celles du plasma sanguin.

Ce phénomène, conjointement à l'effet Farhaeus, entraîne une perfusion du modèle avec un sang de plus en plus appauvri en globules rouges au fur et à mesure que les globules sédimentent. Pour minimiser les variations du taux d'hématocrite en cours d'expérience, une micro seringue est utilisée (Hamilton série 600, volume 10 μL). Le diamètre interne de la micro seringue est de 0,3 mm. Le piston se déplace donc plus rapidement dans une micro seringue pour un même débit, ce qui a pour conséquence d'augmenter la vitesse des globules rouges dans la seringue et contribue par le fait même à maintenir les globules rouges en suspension.

2.4.1 Étude de la constance du pousse seringue

La première étape de création du modèle *in vitro* a été de mesurer la constance de la vitesse du curseur du pousse seringue. Pour ce faire, une lame micrométrique a été fixée au curseur du pousse seringue sans aucune autre charge. La vitesse de déplacement du curseur a été calculée à l'aide de l'algorithme de corrélation proposé au chapitre trois.

La figure 18A montre le déplacement cumulatif du pousse seringue pendant une seconde. Quelques fluctuations apparaissent, donc une certaine variance dans les résultats pourrait être causée par la vitesse du curseur. La figure 18B montre une image de la lame micrométrique utilisée pour cette validation.

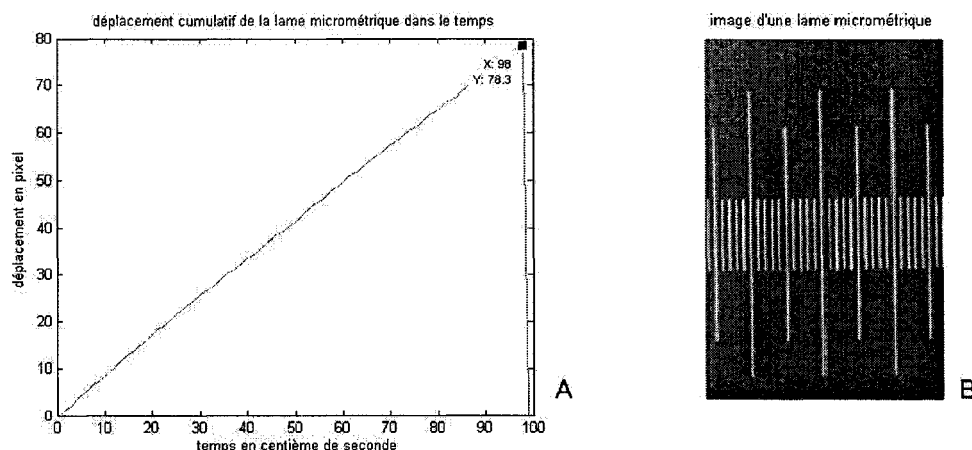


Figure 18 Déplacement du pousse seringue pendant une seconde (A) et image d'une lame micrométrique (B).

2.5 La microscopie

Le microscope *Axiotech Vario* de Zeiss a été choisi comme outil de base pour cette étude. L'espace sous les objectifs est bien adapté au travail intravital. Il peut être utilisé avec des objectifs secs ou à immersion. En microscopie intravitale, l'organe extériorisé doit être immergé dans de la solution saline pour simuler un milieu naturel. Pour cette raison, les expériences sur les souris tout comme celles avec le modèle *in vitro* seront menées avec des objectifs à immersion. Les objectifs à immersion ont généralement une ouverture supérieure aux objectifs secs, ce qui augmente leur résolution et diminue la profondeur de corrélation.

2.5.1 La profondeur de corrélation

La figure 19 montre l'effet de la profondeur de corrélation sur le calcul des vitesses pour des tubes de 30 et 100 μm . Les paraboles de la partie de droite représentent le profil de vitesses théorique du sang dans les tubes. La section des profils de vitesses du sang qui circule dans la région appartenant à la profondeur de corrélation (PC) est encadrée par les rectangles. Lors de la formation de l'image du microscope, la section du profil de

vitesses du sang présent dans ces rectangles est moyennée par l'effet optique puisque que tous les globules rouges circulant dans la région de la PC sont détectés par l'algorithme de corrélation.

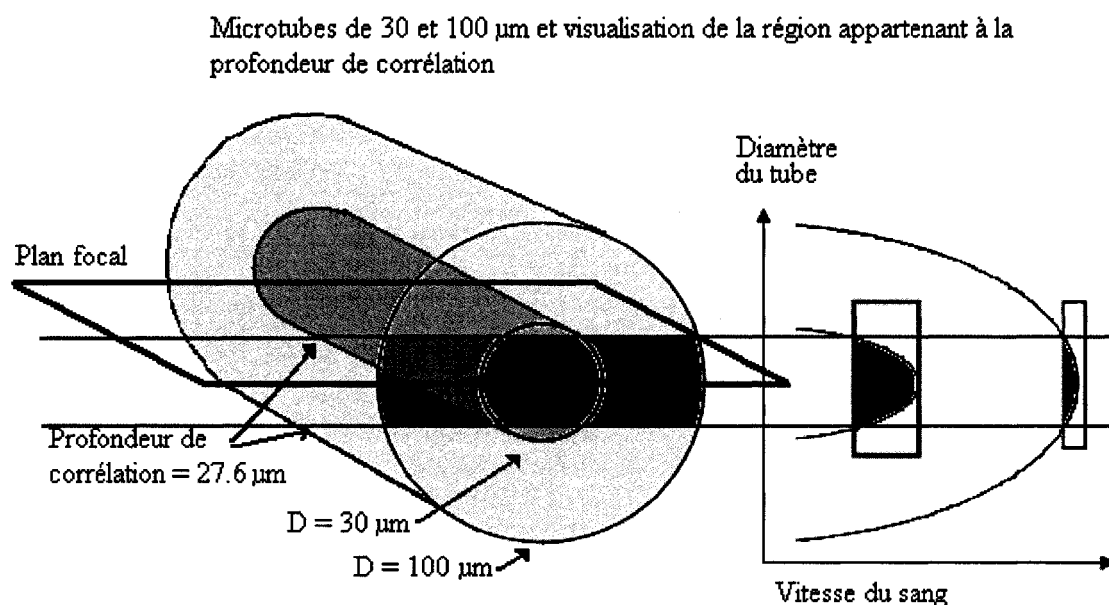


Figure 19 Visualisation de l'effet de la profondeur de corrélation.

Pour un tube de 100 μm , en rouge, on remarque que les vitesses incluses dans le rectangle rouge sont situées sur le plateau de la parabole représentant l'amplitude des vitesses. Pour le tube de 30 μm , en bleu, la région de la parabole incluse dans le rectangle bleu comprend presque toute la plage du profil. Les taches en mouvement sur l'image seront formées par ces globules rouges aux vitesses différentes. La vitesse des taches sera donc la moyenne des vitesses comprises dans les rectangles.

Cet effet est plus important pour les tubes de petit diamètre puisque la plage des vitesses contenue dans le rectangle est plus grande : plus le débit dans le tube est élevé et plus le profil théorique s'allonge, faisant augmenter la plage de vitesses contenue dans la moyenne. La différence entre la vitesse maximum réelle des globules rouges au centre du tube et la vitesse maximum des taches est donc proportionnelle au débit et au diamètre du tube.

C'est pour des tubes dont le diamètre varie de 20 à 60 μm que cet effet est le plus contraignant. Pour les vaisseaux plus petits que 20 μm , des techniques moins sensibles à la profondeur de corrélation peuvent être utilisées, par exemple le suivi de particule. Pour des vaisseaux plus gros, par exemple 100 μm , l'effet de la profondeur de corrélation affecte peu le calcul des vitesses. Sugii et al. affirment que pour un tube de 100 μm , les vitesses calculées sont sous-estimées de 3.8% par rapport à la vitesse maximum située au centre du tube (Sugii, Okuda et al. 2005).

Un test préliminaire a permis de constater que la profondeur de corrélation pouvait représenter un problème potentiel pour le calcul des vitesses des globules rouges. La figure 20 désigne cinq images de lame de microscope où est déposée une fine couche de sang. Pour chacune de ces images, le plan focal a été changé, passant de 64 (A) à 24 μm (B) au dessus de l'image au foyer (C) pour ensuite passer à 12 (D) et 44 μm (E) en dessous des globules. Les images A et E représentent la limite à laquelle les globules peuvent être localisés. Les images B et D représentent la position ultime où les globules sont flous, mais encore distinguables. On remarque que les images au dessus, A et B, sont plus éloignées que celles prises en dessous, D et E. La profondeur de corrélation ne semble donc pas symétrique. Si on considère seulement les images B, C et D comme étant suffisamment contrastées pour influencer les calculs de vitesses obtenus avec l'algorithme de corrélation, la profondeur de corrélation pour des globules est de 36 μm et cette plage s'étend de 12 μm en dessous du plan focal jusqu'à 24 μm au dessus.

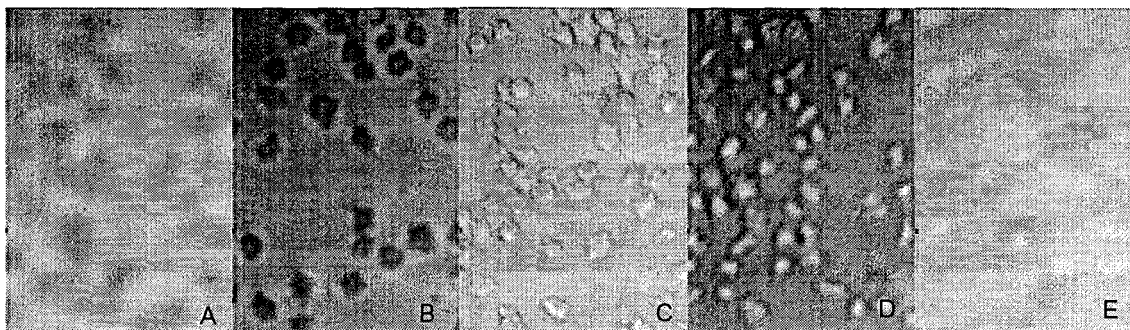


Figure 20 Images de globules rouges prises à 40X pour différents plans focaux. À gauche, 64 μm et 24 μm au dessus de l'image au foyer, au centre l'image est au foyer, à droite 12 μm puis 44 μm en dessous de l'image au foyer.

2.6 L'acquisition vidéo

La caméra retenue pour enregistrer les images de la séquence vidéo est le modèle 1M150 de la compagnie canadienne Dalsa. Elle permet d'enregistrer jusqu'à 150 images numériques à la seconde pour une résolution maximale de 1 024 par 1 024 pixels. Afin d'enregistrer plus d'images à la seconde, il est possible de choisir une région d'intérêt plus petite. Ainsi, pour une fenêtre de 120 par 170 pixels, la vitesse maximale passe à 2 000 images par seconde.

Une carte d'acquisition numérique enregistre les images en temps réel (Hélios, fabriquée par Matrox). Deux logiciels de configuration sont nécessaires pour régler les paramètres de la caméra et de la carte d'acquisition. Les paramètres importants sont la région d'intérêt, le nombre d'images enregistrées par seconde et le temps d'exposition. Un programme informatique a été fait pour permettre de lancer l'enregistrement des images et de sauvegarder les séquences vidéo sur le disque dur de l'ordinateur.

La calibration de la caméra permet de transformer les déplacements en μm et d'exprimer les vitesses en $\mu\text{m/s}$. Elle se fait à l'aide d'une lamelle micrométrique graduée à chaque 10 μm . Un programme informatique quantifie le nombre moyen de pixels entre les traits

pour établir la valeur de calibration pour chaque objectif du microscope (tableau 2). L'adaptateur qui fixe la caméra au microscope grossit d'un facteur 0,63X. Cela permet de filmer une plus grande superficie de la scène, mais diminue le grossissement réel.

Tableau 2

Dimension d'un pixel en fonction de l'objectif utilisé pour la caméra 1M150 de Dalsa utilisé sans zoom optique avec un adaptateur c-mount de 0.63X

Objectif	Dimension d'un pixel (largeur et hauteur)
10X submersible	1,67 μm par 1,67 μm
20X submersible	0,837 μm par 0,837 μm
40X submersible	0,420 μm par 0,420 μm
63X submersible	0,266 μm par 0,266 μm

2.7 L'éclairage de la scène

Le microscope est équipé d'une source lumineuse à fibre optique (Zeiss lk1500) qui vient éclairer la scène par le dessous afin de produire une lumière transmise. Cette source lumineuse de 150 W est alimentée par un courant continu afin d'obtenir un éclairage constant d'une image à l'autre. Cependant, la fréquence d'échantillonnage de la caméra, qui est de 2 000 Hz, est grandement supérieure aux applications de microscopie normales, ce qui se reflète dans les séquences vidéo par une fine variation de l'intensité moyenne d'une image à l'autre.

Le microscope utilisé ne permet pas l'alignement de la lumière transmise pour créer un éclairage dit de Koehler (Foster 2002). Ce type d'éclairage, qui utilise des objectifs de manière à créer un plan lumineux qui se superpose au plan image, pourrait augmenter la quantité de lumière disponible et améliorer la qualité des images. Cependant, son utilisation en microscopie intravitale serait difficile puisque le spécimen bouge lors de la respiration de la souris.

2.8 Les images de synthèse

Les images de synthèse utilisées pour valider l'effet de la profondeur de corrélation sont une projection 2D d'un modèle numérique d'écoulement sanguin 3D. Ce modèle numérique est une adaptation des travaux de Helbing et al. pour la circulation des globules rouges dans un tube (Helbing, Farkas et al. 2000). Dans ce modèle, les globules sont sphériques et leur volume total représente 40% du volume du tube de 30 μm de diamètre (figure 21).

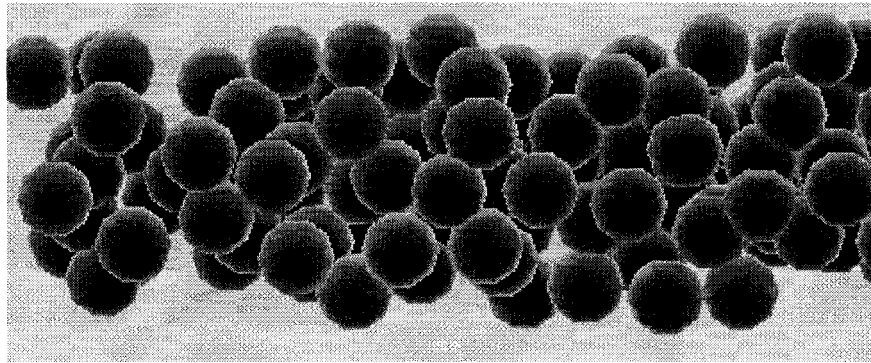


Figure 21 Image des globules dans le modèle informatique en 3D.

Les globules sont d'abord aléatoirement positionnés dans l'espace et déplacés si nécessaire de façon à ce qu'il n'y ait pas de globules les uns dans les autres. À chaque itération, la vitesse de chaque globule rouge, v_i , est calculée en fonction de la somme des forces d'entraînement du flux dans le tube et des forces d'élasticité entre les globules (équation 2.8.1).

$$m_i \frac{dv_i}{dt} = m_i \frac{v_i^d e_i^d - v_i}{\tau} + \sum_{i \neq j} (f_{ij}^e) \quad 2.8.1$$

La force d'entraînement du flux dépend de la vitesse du flux v_i^d , de la forme du profil de vitesses désiré e_i^d et de la vitesse des globules rouges v_i pour chaque intervalle de temps τ . La masse d'un globule, m_i , est de $9,8 \text{ E-14 kg}$. La force d'élasticité f_{ij}^e est calculée selon l'équation 2.8.2 pour les n_{ij} paires de globules rouges i et j dont la distance centre à centre d_{ij} est inférieure à deux fois le rayon R . La constante d'élasticité k des globules rouges est donnée par Drochon et al. comme étant égale à $3,10 \text{ E-6 N/m}$ (Drochon 1990).

$$f_{ij}^e = k(2R - d_{ij})^{3/2} n_{ij} \quad 2.8.2$$

Il est nécessaire d'effectuer une projection pour construire l'image de synthèse 2D qui représente l'écoulement des sphères dans le tube. Olsen et al. décrivent l'intensité lumineuse d'une particule imagée par un microscope en fonction de sa distance relative au plan focal (Olsen and Adrian 2000). Cette formule représente une gaussienne plus ou moins élargie selon la profondeur de corrélation utilisée, dans ce cas-ci $23 \mu\text{m}$ tel que calculé par Meinhart (Meinhart 2000). Cette formule permet de calculer l'intensité lumineuse de chaque globule en fonction de sa position dans le tube. Plus les globules sont loin du plan focal et plus le niveau de gris qui leur est attribué se rapproche du blanc. Le niveau de gris de chaque pixel de l'image de synthèse représente donc la somme des niveaux de gris des globules dans l'axe de projection (figure 22 A).

On remarque, figure 22 B, que les globules ne sont plus distinguables et qu'ils forment plutôt des taches comme dans les images *in vivo*. On peut donc poser l'hypothèse que le profil de vitesses réel des globules pourra être comparé au profil de vitesses des taches créées par la projection 2D.

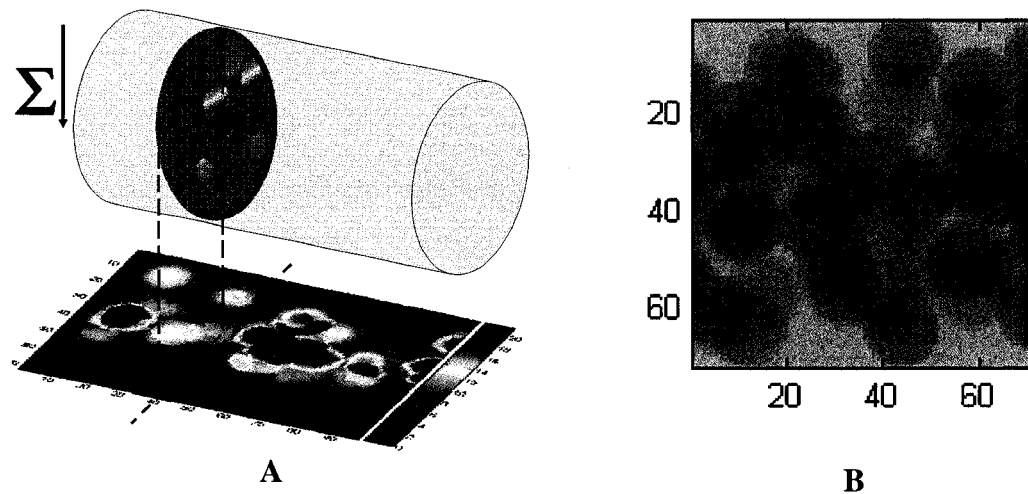


Figure 22 Image de synthèse produite au laboratoire. Le taux d'hématocrite est de 40% et la profondeur de corrélation de 23 μm . La figure A utilise de fausses couleurs pour représenter la sommation de l'intensité des globules dans le tube et ainsi créer une projection 2D du flux. La figure B représente une image en niveaux de gris graduée en pixels dont les dimensions sont les mêmes que pour les pixels de la caméra.

2.9 Synthèse du chapitre deux

Les outils nécessaires à la validation de l'algorithme de corrélation ont été rassemblés et présentés dans ce chapitre. De plus, quelques résultats préliminaires ont permis d'illustrer le choix des technologies présentes dans le modèle *in vitro*. Les diverses étapes de fabrication du modèle *in vitro* montrent bien la difficulté de travailler à l'échelle microscopique. Qu'on pense au pousse seringue ou à la micro seringue, il faut du matériel spécialisé pour assurer une grande précision à cette échelle.

Le modèle semble donc répondre aux exigences de conception. Il permet en outre de créer des images de microcirculation réalistes. Cependant, de petits blocages semblent occasionner des variations momentanées. Pour cette raison, il est préférable de surveiller le flux sanguin pour s'assurer du bon fonctionnement du modèle *in vitro* pendant les expérimentations.

Dans le prochain chapitre seront présentés les étapes de conception de l'algorithme de corrélation ainsi que les outils de calcul du débit. Quelques résultats préliminaires ont permis de mettre au point un algorithme spécialisé pour le calcul des vitesses sur les images de microcirculation sanguine.

CHAPITRE 3

LA CONCEPTION DE L'ALGORITHME DE CORRÉLATION

Le choix de l'algorithme utilisé pour calculer les déplacements a été fait par élimination. Comme le taux d'hématocrite du sang utilisé est de 45%, il est impossible de distinguer les globules rouges autrement que par fluorescence. Les algorithmes de suivi de particule ont donc été rejetés pour éviter d'avoir recours à cette technique. La méthode du flux optique de Lucas et Kanade a été implémentée et testée sans résultat probant (Lucas and Kanade 1981). Il semble que les images soient trop bruitées pour utiliser les dérivés partielles sans nuire à la précision des calculs. La corrélation croisée décrite au premier chapitre apparaît donc comme la méthode la plus appropriée pour cette application. Cet algorithme a été programmé à l'aide du logiciel de calcul MATLAB© grâce au module de traitement d'images.

Trois paramètres influencent le calcul des déplacements obtenus à l'aide de la corrélation croisée, soit : les dimensions et la forme de l'étampe et de la fenêtre ainsi que les filtres utilisés. Ce chapitre explique comment ces paramètres ont été choisis lors de la conception de l'algorithme de corrélation croisée.

L'organigramme de la figure 23 présente la cascade d'opérations qui sont appliquées aux images pour obtenir le débit dans le micro tube.

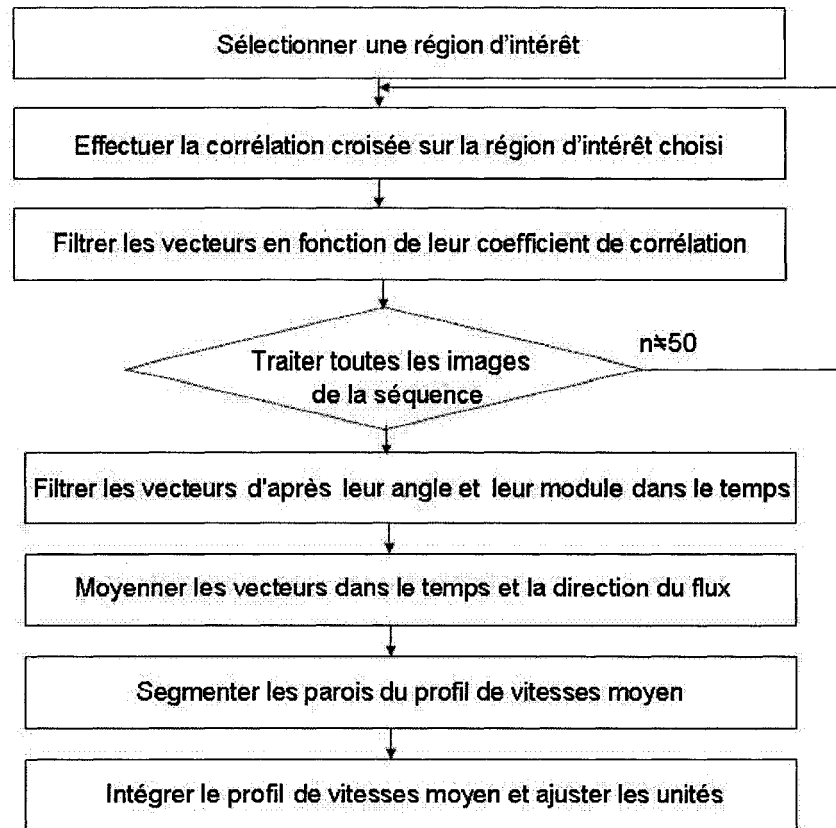


Figure 23 Organigramme de l'algorithme de corrélation.

3.1 Les dimensions de l'étampe et de la fenêtre

Le déplacement calculé par la corrélation croisée représente le déplacement moyen des particules dans l'étampe. Les dimensions de l'étampe influencent donc la résolution spatiale des calculs de déplacement. Si l'étampe est grande, le déplacement obtenu représentera une grande surface et donc la résolution spatiale sera faible. Par opposition, si l'étampe ne contient qu'un pixel de large, le déplacement ainsi calculé représentera seulement une direction et la résolution spatiale sera grande.

Les dimensions de l'étampe sont aussi dictées par la nécessité d'utiliser une surface suffisamment grande pour permettre de repérer l'étampe dans la fenêtre. Pour optimiser la précision des calculs, l'étampe doit contenir une dizaine de particules faisant chacune 2 ou 3 pixels carrés (Wereley and Meinhart 2005). Dans cette étude, les particules utilisés, les globules rouges, ont une surface d'environ 200 pixels carrés lorsqu'un grossissement de 40X est utilisé. Il devient alors inapproprié d'utiliser cette règle pour fixer la taille de l'étampe. Cependant, les taches visibles sur les images de microcirculation sanguine sont plus petites que la taille des globules rouges mais demeurent beaucoup plus grandes que les dimensions optimums. Cet effet est dû à la profondeur de corrélation qui effectue une sommation des ombres projetées par les globules rouges se trouvant au dessus ou en dessous du plan focal. Par conséquent les calculs de vitesses des globules rouges ne sont pas optimums et la précision ne sera pas aussi grande que pour une application de μ PIV typique.

Les dimensions de la fenêtre influencent le déplacement maximum qu'il est possible de calculer à l'aide de la corrélation croisée. Plus le déplacement que l'on cherche à calculer est grand, plus la zone de l'image d'arrivée où il faudra chercher la ressemblance sera grande. Le déplacement maximum qui peut être mesuré par l'algorithme de corrélation correspond à la moitié de la différence entre la dimension de la fenêtre et la dimension de l'étampe dans le sens du déplacement. La dimension de la fenêtre est cependant limitée par l'hypothèse de départ qui veut que l'intensité lumineuse des particules n'ait pas changé d'une image à l'autre. Il est donc plus facile de valider cette hypothèse lorsque les distances parcourues entre les deux images sont plus grandes qu'un pixel tout en demeurant les plus petites possible.

La plupart des articles scientifiques mentionnent les dimensions des étampes et fenêtres utilisées, mais peu exposent la méthode ayant servi à fixer ces dimensions. Le choix des dimensions dépend donc en grande partie de l'application. Scarano présente une étude de la précision de l'algorithme de corrélation en fonction de la taille des fenêtres et des

étampes (Scarano 2003). D'autres études donnent quelques conseils pour ajuster les dimensions, malheureusement les images réalisées sur le sang ne ressemblent pas aux images de PIV classiques et ces concepts ne s'appliquent qu'en partie (Westerweel 1997; Raffel, Willert et al. 1998; Wereley and Meinhart 2005). La méthode pour fixer la taille de la fenêtre et de l'étampe demeure donc la minimisation des erreurs des vitesses calculées, ce que le modèle *in vitro* nous permet de réaliser.

Plusieurs grandeurs de fenêtres et d'étampes ont été testées sur les séquences d'images *in vitro*. Les dimensions retenues pour la présente étude sont de 15 par 15 pixels pour l'étampe. La superficie de la fenêtre est 60 par 60 pixels soit quatre fois plus grande que celle de l'étampe. Ces dimensions permettent de détecter des déplacements allant jusqu'à 29 pixels. Elles sont optimisées pour des séquences filmées à 2 000 images à la seconde avec un grossissement de 40X pour les débits allant jusqu'à 27 $\mu\text{L/h}$.

L'algorithme peut donc mesurer des vitesses pouvant atteindre 24 mm/s ce qui est supérieur aux vitesses physiologiques dans des artérioles de 30 μm soit 11 mm/s. Les dimensions choisies sont comparables à celles utilisées dans la littérature (Sugii, Nishio et al. 2002). Ces dimensions pourront être utilisées lors d'expériences *in vivo* puisque les images produites par le modèle *in vitro* sont semblables.

3.1.1 La forme de la fenêtre et de l'étampe

Tsukada et al. utilisent des fenêtres et des étampes rondes pour diminuer les effets de bords causés par l'orientation du vaisseau (Tsukada, Minamitani et al. 2000). Toro et al. proposent plutôt d'imposer une rotation aux images pour orienter le flux de gauche à droite dans l'image et ainsi simplifier les calculs (Toro, Chayer et al. 2006).

Ces études démontrent que la forme de la fenêtre et de l'étampe peuvent être adaptées à l'application lorsque des connaissances *a priori* permettent de connaître la direction du

flux. Dans le modèle *in vitro*, les déplacements en direction de la paroi sont minimes. Il serait donc possible de réduire les dimensions de la fenêtre et de l'étampe dans cette direction pour améliorer la résolution latérale des calculs de déplacement comme font Wereley et Meinhart en utilisant des fenêtres rectangulaires de 120 par 8 pixels (Wereley and, Meinhart 2005).

Il serait possible d'utiliser cette solution *in vivo* en modifiant les images de la séquence vidéo. Il faudrait d'abord choisir un vaisseau d'intérêt avec une section rectiligne et le segmenter pour trouver son orientation. Une rotation serait alors imposée aux images de la séquence pour permettre l'utilisation d'une étampe rectangulaire. Pour conserver la superficie de l'étampe, plus on l'aminci plus elle doit être longue. Par exemple, si l'algorithme fonctionne bien avec une étampe de 15 par 15 pixels, on peut présumer qu'une étampe de 8 par 28 pixels donnerait de bons résultats. Cependant, la forme et la dimension des taches influencent aussi la forme optimale de l'étampe.

Cette technique nécessiterait de poser l'hypothèse supplémentaire que les particules comprises dans l'étampe se déplacent de façon rectiligne et parallèle aux parois du vaisseau. Or, les vaisseaux présents dans la micro circulation sont tortueux et leurs sections rectilignes sont très courtes. Pour ces raisons l'utilisation de fenêtre et d'étampe carrées a été favorisée. Elle permet l'utilisation de l'algorithme peu importe l'orientation et la forme des vaisseaux.

3.1.2 Le chevauchement des étampes

L'algorithme de corrélation permet de calculer le déplacement pour une position dans l'image, soit le pixel se trouvant au centre de l'étampe. Il faut donc répéter ce calcul pour chaque pixel dont le déplacement mérite d'être connu. Si la distance entre deux pixels où les déplacements sont calculés est plus petite que la dimension de l'étampe, il se produit un chevauchement entre les étampes pour ces pixels. Pour satisfaire la règle

d'échantillonnage de Nyquist, qui veut que la fréquence d'échantillonnage minimum requise pour échantillonner un signal doit être deux fois supérieure à la fréquence de ce signal, un chevauchement de l'étampe de 50% est suffisant (Nyquist 1928). Un suréchantillonnage se produit lorsque le chevauchement est plus grand que la moitié de l'étampe. La figure 24 montre que si on utilise une étampe de 15 par 15 pixels, un chevauchement de la fenêtre de 50% nous donnera un vecteur de déplacement tous les 7 pixels, tandis qu'un chevauchement de 100% moins un pixel donne des vecteurs pour chaque pixel.

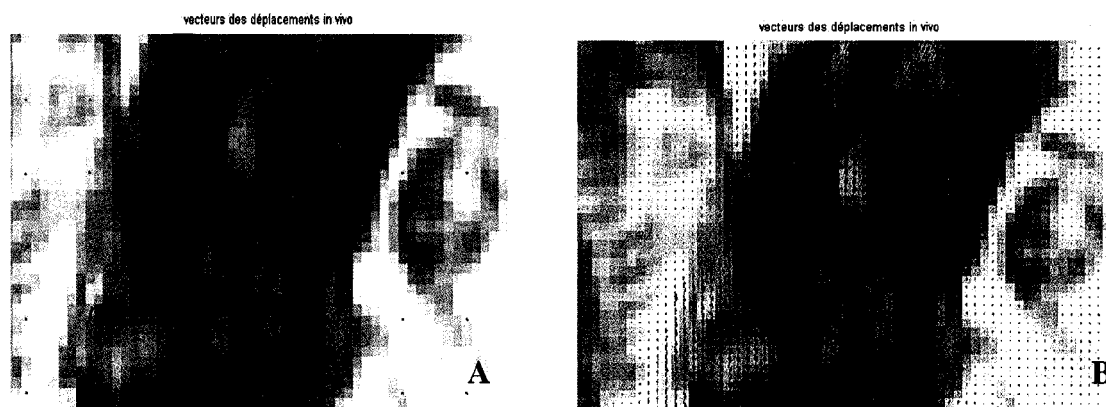


Figure 24 Les vecteurs des déplacements selon deux chevauchements différents. En A un chevauchement de 50% et en B un chevauchement de 100% moins un pixel lorsqu'une étampe de 15 par 15 pixels est utilisée. Cette image est un agrandissement de la région contenue dans le rectangle noir de la figure 24 B.

Lorsque le chevauchement est maximum, il est possible d'obtenir les vitesses de chaque pixel. Appliquée sur toute l'image, cette méthode permet d'apprécier les vitesses du système microcirculatoire en observation. La figure 25A présente une carte de la vitesse des globules rouges en mm/s dans des artérioles d'environ 30 μm . La figure 25B présente une vue du système microcirculatoire ayant servi aux calculs. Le chevauchement maximum de l'étampe permet d'obtenir beaucoup plus de vecteurs vitesses et contribue à améliorer les techniques de filtres discutées au chapitre 3.2.

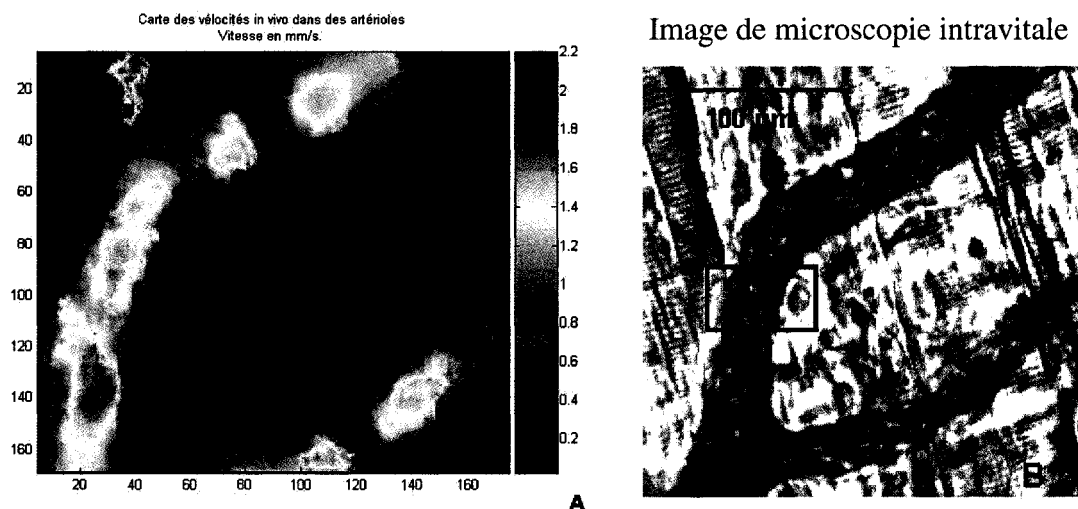


Figure 25 Carte des vitesses dans des artérioles et image de microscopie intravitale correspondante. Les vitesses sont affichées en millimètre par sec. La fenêtre utilisée est de 60 par 60 pixels, l'étampe de 15 par 15 pixels et un chevauchement de 100% moins un pixel a été choisi pour cet exemple. Les calculs ont été effectués sur une image d'artériole provenant de microscopie intravitale sur une souris contrôle.

3.1.3 Test in vitro pour trois grandeurs de fenêtres

La figure 26 présente 3 profils de vitesses types calculés en utilisant des fenêtres de dimensions différentes pour un débit *in vitro* de 22 $\mu\text{L/h}$. Les parois du tube sont représentées par les traits verticaux aux pixels 13 et 88 sur l'axe des X. Pour une fenêtre de 44 par 44 pixels, en noir, on remarque que le profil s'écrase au centre de l'écoulement. Or, les vitesses maximales se trouvent au centre du tube, comme le montre le profil calculé avec une fenêtre de taille suffisante, soit 60 par 60 pixels (en rouge). Lorsqu'une plus petite fenêtre est utilisée, par exemple 22 par 22 pixels, le profil est totalement écrasé (en bleu). La forme du profil de vitesses peut donc servir à valider le choix des dimensions de la fenêtre. Un profil creux au centre révèle l'utilisation d'une fenêtre trop petite. La vitesse maximum du profil rouge est de 11 mm/s, ce qui correspond à une vitesse moyenne physiologique pour une artériole de cette taille (Fung 1993).

En comparant les deux profils obtenus avec les fenêtres de 44 par 44 et de 60 par 60 pixels (en noir et rouge), on remarque que la largeur du profil n'est pas la même. Dans le cas présent, les étampes utilisées ont des dimensions de 11 par 11 et de 15 par 15 pixels carrés respectivement. Le fait que le profil soit quatre pixels plus large est donc dû aux effets de bords de l'étampe. À l'extérieur du tube, le fond de scène est presque uniforme. Il suffit donc des quelques pixels de la lumière pour que la corrélation se verrouille sur la vitesse du flux. Une segmentation effectuée sur les images du tube plutôt que sur les profils permet de ne garder que les vecteurs qui sont inscrits dans la lumière du tube.

On remarque aussi que le profil de vitesses obtenu par corrélation ne contient pas de vitesses nulles près des parois alors que le profil théorique (en vert) commence à zéro. L'algorithme de corrélation moyenne les vitesses dans l'espace de façon proportionnelle aux dimensions de l'étampe. Le déplacement calculé reflète donc le déplacement moyen des particules présentes dans l'étampe. Plus l'étampe est grande et plus la résolution spatiale est petite. Dans notre application, la faible résolution spatiale crée des profils aplatis dus au moyennage spatial selon l'axe des X de la figure 25. Cet effet combiné à celui de la profondeur de corrélation explique en partie la différence entre les profils théoriques et pratiques. Du reste il se peut que le profil présent dans le micro tube ne corresponde pas au profil théorique. Par exemple, un taux d'hématocrite plus élevé que le taux physiologique pourrait créer des profils de vitesses plats. Cela aurait pour effet de minimiser l'impact de la profondeur de corrélation sur la précision des calculs de vitesses.

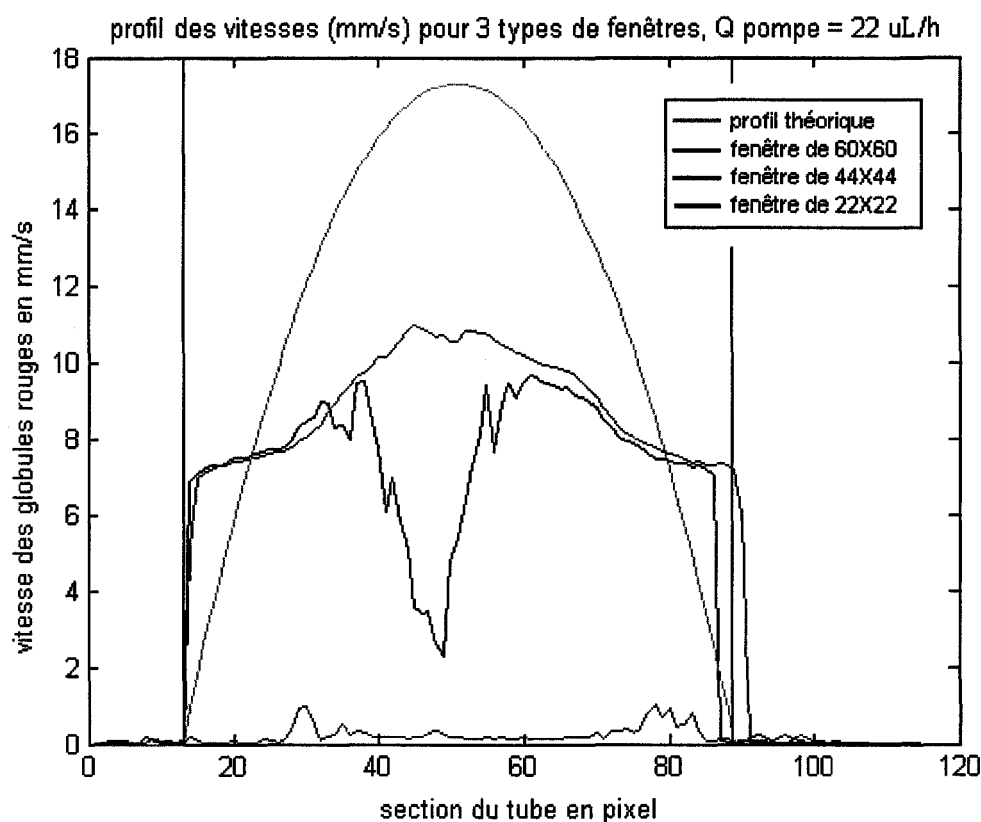


Figure 26 Profil des vitesses calculés en utilisant trois fenêtres de dimensions différentes. Expérience réalisée avec du sang lavé à 45% d'hématocrite dans un tube de 30 μ m pour un débit de 22 μ L/h. Une fenêtre de 22 par 22 pixels utilisée avec une étampe de 11 par 11 pixels est trop petite pour détecter les vitesses élevées créées par le débit de 22 μ L/h (en bleu). Lorsque la fenêtre est de 44 par 44 pixels et l'étampe de 11 par 11 pixels, le profil se dessine, mais les vitesses au centre de l'écoulement restent sous-estimées (en noir). Une fenêtre de 60 par 60 pixels et une étampe de 15 par 15 pixels permettent de calculer les vitesses de tout le profil (en rouge). En vert, le profil théorique pour un écoulement de Poiseuille dans un tube de mêmes dimensions.

3.2 Les filtres

Lorsque l'algorithme de corrélation croisée est exécuté, il calcule toujours un déplacement peu importe la qualité ou la ressemblance entre les images. Il faut donc

éliminer les déplacements qui sont erronés en utilisant des filtres. La figure 27 montre un agrandissement du flux sanguin dans un tube de $30\text{ }\mu\text{m}$ où les déplacements calculés par l'algorithme de corrélation sont représentés par les vecteurs. Les vecteurs bleus sont considérés comme normaux. Les vecteurs verts et rouges ont un module et un angle différent de la moyenne de tous les vecteurs respectivement.



Figure 27 Agrandissement d'une image *in vitro* du flux sanguin dans un micro tube de $30\text{ }\mu\text{m}$ pour du sang lavé et un débit de $15\text{ }\mu\text{L/h}$ filmé à 40X. Les vecteurs de déplacements calculés par une étampe de 15 par 15 pixels et une fenêtre de 60 par 60 pixels sont représentés par les flèches. Les vecteurs bleus sont considérés comme normaux. Les vecteurs verts et rouges ont un module et un angle différent de la moyenne de tous les vecteurs respectivement. La longueur des vecteurs a été ajustée à la taille de l'image.

Pour éliminer les mauvais déplacements, les logiciels de PIV ont recours à plusieurs sortes de filtres. Les filtres les plus souvent utilisés sont basés sur la variance spatiale, la Variance Temporelle et la Variance Globale des vecteurs. Les moyennes temporelles et spatiales sont aussi très répandues. Les valeurs numériques utilisées par les filtres sont l'angle des vecteurs, leurs modules ou encore la valeur du coefficient de corrélation (Sveen 2004).

Pour augmenter l'efficacité des filtres, les vecteurs qui ont les mêmes propriétés sont rassemblés entre eux puis filtrés. Par exemple, on peut s'attendre à ce que la vitesse pour une position donnée dans l'image soit constante dans le temps. Ainsi, tous les vecteurs de la séquence qui ont la même position dans l'image seront regroupés et filtrés entre eux. Ceci facilite l'identification des vecteurs erronés. Dans le cas présent, les propriétés utilisées sont le temps pour une position donnée dans l'image et la position dans le sens de l'écoulement.

Les filtres qui utilisent la variance pour discriminer les vecteurs erronés permettent de rejeter les valeurs trop grandes et trop petites pour ne garder que ceux qui sont près de la valeur médiane. La plage des valeurs qui seront considérées comme justes correspond à la valeur médiane plus et moins le coefficient de portée multiplié par l'écart type des données à filtrer. Le choix du coefficient peut être trouvé à l'aide d'un histogramme ou de la covariance interclasse (Otsu 1979).

Le programme Matlab attribue la valeur *Not a Number (NaN)* plutôt que la valeur zéro aux vecteurs qui ont été rejetés. Cela permet de différencier les vecteurs aberrants des vecteurs dont la vitesse est nulle. De plus, cette méthode facilite l'utilisation des filtres en n'influençant pas le calcul de la valeur médiane et des écarts types.

Une fois les données filtrées, un vecteur moyen est créé avec tous les vecteurs ayant les mêmes propriétés. Ce filtre est très efficace puisque, pour les applications de flux sanguin *in vitro*, plusieurs vecteurs présentent des propriétés similaires dans le temps et dans l'espace. Il est donc possible de moyenner les déplacements dans le sens de l'écoulement pour une seule paire d'images puisque le gradient de vitesses dans cette direction est très petit. C'est de cette façon que sont construits les profils de vitesses moyens qui serviront à l'estimation du débit.

3.2.1 Étude de différents filtres

Pour éliminer efficacement les vecteurs aberrants, il faut savoir ce qui les a causés. Lorsque l'on regarde de près les vecteurs aberrants, on remarque qu'ils sont surtout présents au centre de l'écoulement et sur les côtés.

On peut expliquer la présence de vecteurs aberrants au centre du vaisseau par une mauvaise ressemblance entre les deux images consécutives. Le centre de l'écoulement est l'endroit où les vitesses sont les plus élevées. C'est donc à cet endroit que la fréquence d'échantillonnage a la plus grande influence. Les vecteurs aberrants de cette région présenteront un angle différent de celui de l'écoulement, mais un module ainsi qu'un coefficient de corrélation plus petits que la moyenne si la fréquence d'échantillonnage de la caméra n'est pas assez rapide.

Les vecteurs aberrants sur les parois du vaisseau sont causés par un manque d'information dans l'étampe. À cet endroit, l'étampe est composée de pixels appartenant à la lumière et de pixels appartenant à l'arrière-plan. Les vecteurs aberrants issus de cette corrélation présentent un grand coefficient de corrélation, leurs angles sont différents de celui de l'écoulement et les modules sont généralement plus grands.

Les vitesses à l'intérieur du vaisseau changent rapidement d'un pixel à l'autre le long du profil. Pour cette raison, les filtres global et spatial sont à déconseiller. Ils ont pour effet d'éliminer les plus grands et les plus petits vecteurs. Le profil de vitesses créé par le filtre global a tendance à être plat comme le montre le profil noir à la figure 28. Le filtre spatial, en rouge, crée artificiellement une inclinaison sur les parois du tube. Le résultat est semblable au profil magenta qui présente la moyenne temporelle et dans le sens de l'écoulement de tous les profils de la séquence d'images sans autre filtration. Cette figure montre aussi un profil non filtré en cyan. Ce profil, très bruité, montre une fois de plus la nécessité de filtrer les vecteurs vitesses obtenus. Le profil bleu est le résultat d'une

filtration temporelle. De tous les profils, c'est celui-ci qui représente le mieux un profil parabolique. Un profil plat se dessine lorsque tous les filtres sont utilisés simultanément, en vert. La description détaillée des filtres testés est présentée à l'annexe 1.

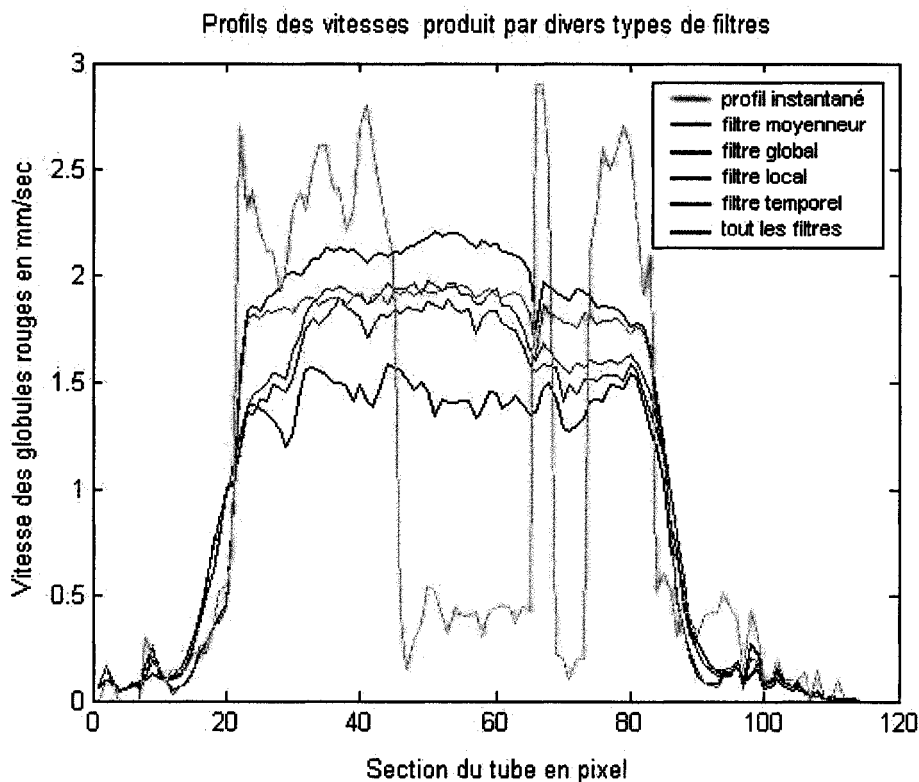


Figure 28 Les profils de vitesses créés par l'utilisation de différents filtres. En turquoise, on voit un profil instantané qui forme le profil moyen en magenta. Lorsque l'on utilise un filtre global, un profil plat se dessine (en noir). Le filtre local, pour sa part, agit comme un filtre moyennneur dans l'espace et tente de rendre le profil parabolique (en rouge). Le filtre temporel utilise seulement l'information d'un pixel, pour cette raison il élimine les données aberrantes sans changer la forme du profil (en bleu). Lorsque ces trois filtres sont utilisés conjointement, le profil rendu semble sous-estimer les vitesses et aplanir le profil (en vert). Un débit de $10 \mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de $30 \mu\text{m}$ a été utilisé pour cette expérience *in vitro*. Une fenêtre de 44 par 44 pixels a été utilisée conjointement à une étampe de 11 par 11 pixels pour le calcul des déplacements.

3.2.2 Le coefficient de corrélation

En plus des vecteurs de déplacement, l'algorithme de corrélation croisée calcule un coefficient de corrélation. Ce coefficient représente le niveau maximum de ressemblance entre l'étampe et la fenêtre. Une méthode pour filtrer les vecteurs aberrants consiste à rejeter les vecteurs lorsque leur coefficient de corrélation est inférieur à un seuil. En d'autres termes, si la ressemblance n'est pas assez grande entre l'étampe et la fenêtre, la valeur du déplacement calculée est considérée comme erronée.

Le seuil utilisé dans la littérature est généralement de 50% (Tsukada, Minamitani et al. 2000). Des expériences où le seuil du coefficient de corrélation a été augmenté à 85% ont démontré que les vitesses mesurées n'étaient plus valides au centre de l'écoulement. La figure 29 A montre une carte des vitesses obtenues avec un seuil de 50%. Le sang circule dans le modèle *in vitro* de la gauche vers la droite à un débit de 5 $\mu\text{L/h}$. Le centre du tube (ligne 80 de l'axe des Y) montre des déplacements de 12 pixels par image, tandis que les bords (ligne 30 et 110 de l'axe des Y) sont à 7 pixels par image. La figure 29 B montre la carte des vitesses, calculées sur les mêmes images, lorsque le seuil est de 85%. On remarque que les vitesses au centre de l'écoulement sont nulles. Seuls les vecteurs sur les côtés présentent des coefficients de corrélation suffisamment élevés pour être conservés. Les déplacements aux bords des parois sont plus élevés que pour la carte obtenue avec un seuil de 50%, soit 15 pixels par image plutôt que 7. Ceci confirme la présence, dans cette région, de vecteurs aberrants ayant un coefficient de corrélation plus grand que les vecteurs qui sont juste. En conclusion, dans notre situation, l'utilisation d'un coefficient de corrélation plus élevé que 50% est à proscrire puisque son effet n'est pas le même partout dans le tube.

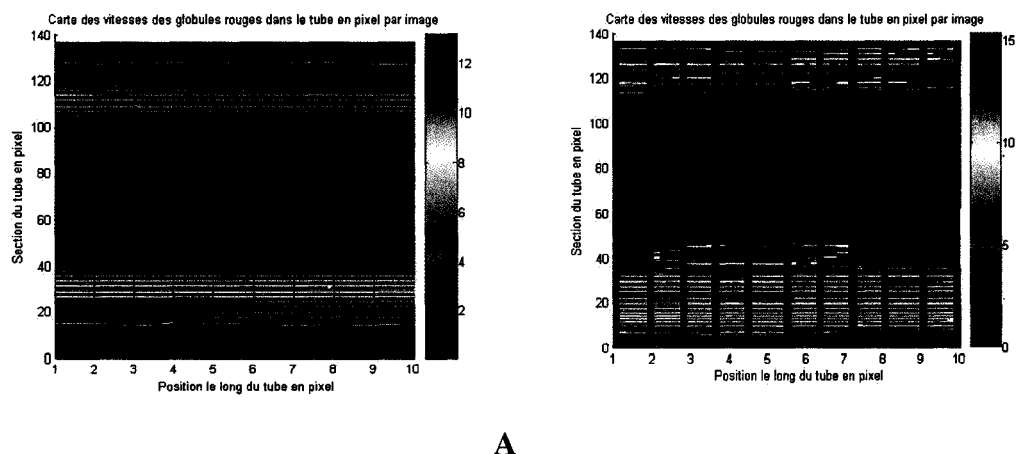


Figure 29 Effet du seuillage par l'utilisation du coefficient de corrélation sur les vitesses calculées. En A, la carte des vitesses obtenues pour une section du tube lorsque tous les vecteurs ayant un coefficient de corrélation inférieur à 50% ont été filtrés. En B, la même section a été filtrée avec un seuil de 85%. On remarque que tous les vecteurs au centre de l'écoulement ont été filtrés car leur coefficient de corrélation était inférieur à 85%. Un débit de 15 $\mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de 30 μm a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 44 par 44 pixels a été utilisée conjointement à une étampe de 11 par 11 pixels pour le calcul des déplacements.

3.2.3 Les filtres retenus

Les filtres ont été choisis de façon à éliminer le plus de vecteurs aberrants dans les deux zones problématiques. Dans un premier temps, les vecteurs qui ont un coefficient de corrélation inférieur à 50% sont rejetés. Ensuite, un filtre temporel retire les vecteurs qui présentent un angle différent de la médiane pour une position donnée dans les images de la séquence. L'histogramme (figure 30 A) représente les angles, en radians, des vecteurs d'un pixel pour une séquence vidéo de 50 images. On remarque que les vecteurs aberrants sont très différents de la valeur ayant la plus grande population, soit environ 1,25 radian. Typiquement, un coefficient de portée de 1 donne de bons résultats pour filtrer les vecteurs aberrants ayant un angle différent de la médiane sur les images *in vitro*.

Le même filtre est utilisé pour éliminer les vecteurs ayant un module de vitesse différent de la médiane dans le temps pour une position donnée dans les images de la séquence. Dans ce cas, l'histogramme (figure 30 B) montre que les valeurs des vitesses sont plus étalées et qu'un petit coefficient de portée aurait pour effet de rejeter trop de vecteurs. Typiquement, un coefficient de portée de 1,0 est utilisé pour filtrer les modules.

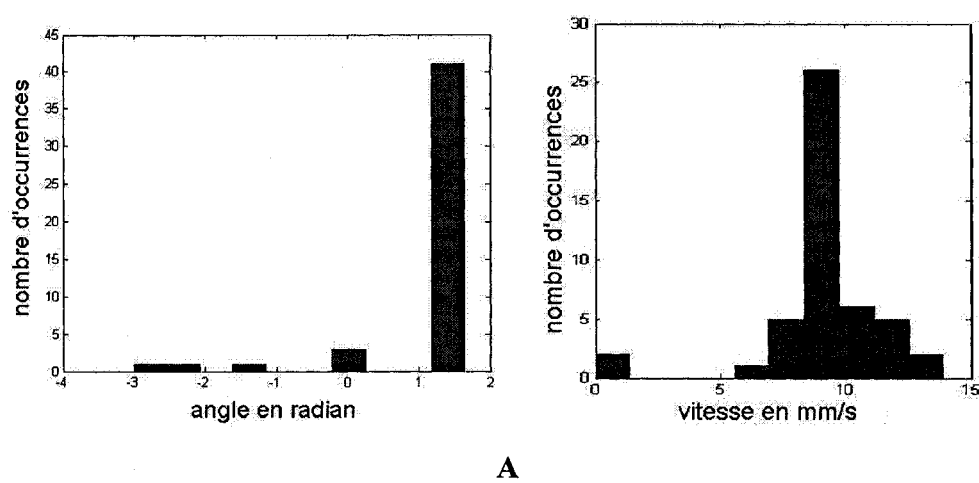


Figure 30 Histogrammes des angles, en radians (à gauche), et des modules de vitesses, en mm/s (à droite), des vecteurs calculés pour un pixel d'une séquence de 50 images consécutives. Un débit de 20 $\mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de 30 μm a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 44 par 44 pixels a été choisie conjointement à une étampe de 11 par 11 pixels pour le calcul des déplacements. La position du pixel pour ces histogrammes correspond au centre du tube.

Finalement, les modules de chaque vecteur sont moyennés selon la direction du flux. Cette méthode permet d'obtenir le module moyen de la vitesse pour tous les pixels de l'image. Pour obtenir le profil de vitesses moyen de la séquence, les modules de vitesses sont ensuite moyennés dans le temps selon leur position le long du diamètre pour les 50 images de la séquence vidéo. Le profil moyen représente donc tous les pixels de la séquence vidéo.

La figure 31 montre l'évolution de la valeur du débit estimé en fonction du nombre d'images moyennées. Pour cette expérience un débit de 5 $\mu\text{L/h}$ de sang lavé a été utilisé dans le modèle *in vitro*. Un plateau apparaît à 4,7 $\mu\text{L/h}$ lorsque la moyenne compte environ 100 images. Ce qui tend à démontrer qu'il serait inutile d'utiliser plus d'images dans la moyenne pour obtenir une valeur stable.

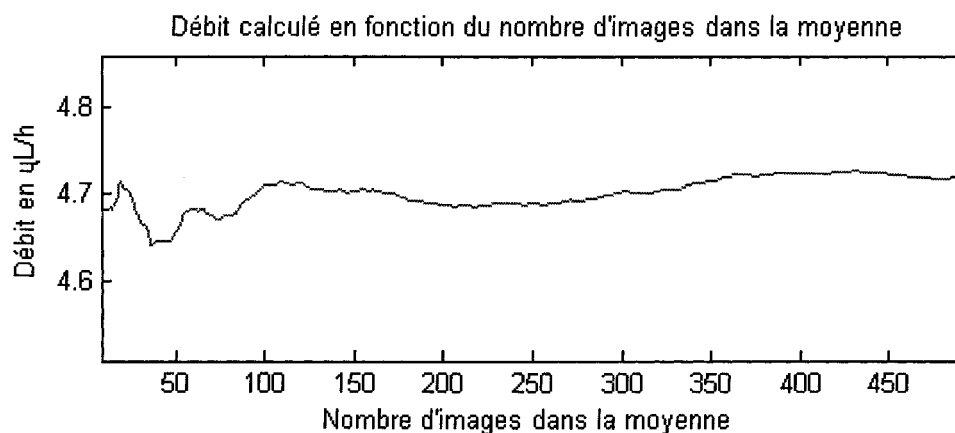


Figure 31 Débit moyen, en $\mu\text{L/h}$, en fonction du nombre d'images moyennées. Un débit de 4,7 $\mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de 30 μm a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 44 par 44 pixels a été choisie conjointement à une étampe de 11 par 11 pixels pour le calcul des déplacements.

Lorsque l'on calcule la variance des débits en fonction du nombre d'images utilisées pour la moyenne, on remarque que pour deux fois moins d'images dans la moyenne, la variance n'augmente que du quart (figure 32). La moyenne est donc effectuée sur 50 images puisque la variance est suffisamment petite (variance typique de 0,038 $\mu\text{L/h}$ pour un débit moyen de 5,24 $\mu\text{L/h}$ ce qui donne un coefficient de variation moyen de 3,7%).

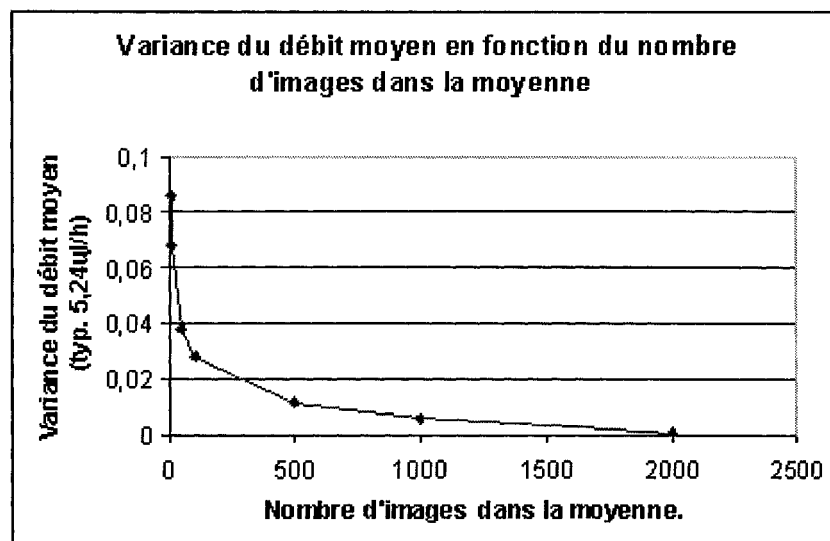


Figure 32 Variance du débit moyen en fonction du nombre d'images dans la moyenne. Un débit moyen de 5,24 $\mu\text{L/h}$ de sang lavé dans un micro tube de 30 μm a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 44 par 44 pixels a été choisie conjointement à une étampe de 11 par 11 pixels pour le calcul des déplacements.

L'utilisation d'information temporelle pourrait causer des problèmes si le débit change durant le temps. Par exemple, durant une expérience *in vivo* le débit peut changer voire même s'arrêter complètement. Cependant, 50 images sont suffisantes pour les techniques de filtration retenues, ce qui représente 0,025 seconde pour une fréquence d'échantillonnage de 2 000 images par seconde. On peut alors présumer que les phénomènes *in vivo* sont moins rapides que le temps nécessaire aux techniques de filtrage et donc utiliser l'information temporelle pour nos filtres semble une option valable.

3.3 L'estimation du débit

La méthode retenue pour valider les vitesses calculées par l'algorithme de corrélation consiste à estimer le débit du sang dans le micro tube et à le comparer au débit de la pompe. L'estimation du débit peut être faite de 2 façons différentes. La première façon consiste à effectuer une intégration numérique du profil de vitesses moyen. La méthode

de la vitesse moyenne multipliée par la surface de la lumière du tube peut aussi être utilisée. Dans ce travail, ces deux façons d'estimer le débit ont été comparées pour trouver la méthode la plus précise pour notre application.

3.3.1 L'intégrale numérique et la vitesse moyenne

Pour obtenir un estimé du débit sanguin dans le modèle *in vitro*, le profil de vitesses moyen ($V(r)$) est intégré numériquement. L'intégrale est effectuée en coordonnées circulaires puisqu'elle représente l'écoulement dans un tube. Les bornes de l'intégrale correspondent aux positions des vitesses calculées le long du rayon du tube, r , en pixels. De cette façon, le débit tient compte de la forme du profil de vitesses puisqu'il n'est pas toujours symétrique selon r .

$$Q = \pi \int_{-r}^{+r} V(r) dr \quad (3.3.1.1)$$

L'estimé du débit sanguin dans le modèle *in vitro* peut aussi être calculé en multipliant la vitesse moyenne par la surface du microtube. Le calcul de la vitesse moyenne (V_{moy}) correspond à la moyenne des vitesses contenues dans le profil de vitesses moyen.

$$V_{moy} = \frac{\sum_{-r}^{+r} V(r)}{2r} \quad (3.3.1.2)$$

3.3.2 La segmentation

Lors de l'estimation du débit par les deux méthodes pré-citées, une segmentation précise des parois du vaisseau est importante afin de ne pas influencer les résultats. La segmentation permet d'éliminer les vitesses calculées à l'extérieur de la lumière du tube

avant qu'elles ne soient prises en compte dans l'estimé du débit. L'intégrale d'un profil plus large que la lumière du tube donnerait un débit plus élevé que le débit réel même si les vitesses à l'extérieur du tube sont minimales. Le profile de vitesses moyen se doit donc d'être limitée à la lumière du tube pour être précise.

Cette étape est importante pour assurer une bonne précision aux débits estimés. Comme l'algorithme de corrélation croisée fournit des vitesses pour toute la surface de l'image, le profil moyen est souvent plus large que la lumière du tube, voir figure 25. Il est donc plus facile de segmenter la lumière du tube sur l'image de microscopie plutôt que sur le profil moyen.

Dans le modèle *in vitro*, la lumière est rectiligne et de diamètre connu. Il est dès lors possible de la segmenter avec des informations *a priori* comme le nombre de pixels que compte le diamètre du tube.

3.3.3 Les autres sources d'erreurs

Le profil de vitesses est intégré pour obtenir un estimé du débit sanguin dans le tube. Pour respecter les lois du calcul intégral, ce profil doit représenter une couche infiniment mince de particules circulant dans le plan central du tube. Cependant, la profondeur de corrélation, le type d'éclairage et la taille des globules rouges font en sorte que le profil représente non pas une fine couche, mais toute l'épaisseur du tube. L'intégrale devrait donc surévaluer le débit calculé puisque la profondeur de corrélation n'est pas négligeable en comparaison du diamètre du tube. D'autre part, tel qu'expliqué précédemment, la moyenne spatiale due à la superficie de l'étampe et de la profondeur de corrélation font en sorte que les vitesses calculées sont plus petites que les vitesses des globules rouges. Par conséquent la précision des vitesses calculées est affecté.

3.4 Synthèse du chapitre trois

Ce chapitre, dédié à l'élaboration de l'algorithme de calcul des vitesses des globules rouges, a montré les étapes de conception qui ont mené à l'élaboration du programme informatique.

Les dimensions de la fenêtre et de l'étampe ont été ajustées pour permettre le calcul précis des déplacements à l'aide de l'algorithme de corrélation. Des séquences d'images de microcirculation sanguine enregistrées avec le modèle *in vitro* ont permis de faire des tests préliminaires et de choisir les filtres les plus efficaces pour retirer les vecteurs aberrants que produit l'algorithme de corrélation. Les multiples paramètres de l'algorithme de corrélation et des filtres montrent qu'il est possible d'adapter l'algorithme en fonction des déplacements maximums, de la qualité des images, etc. C'est pour cela que des expériences préliminaires sont nécessaires pour ajuster les paramètres de l'algorithme.

Finalement, deux méthodes pour estimer le débit sanguin dans le tube, soit en intégrant le profil de vitesses moyen et l'utilisation de la vitesse moyenne multipliée par la surface de la lumière du tube, ont été présentées. Il sera donc possible de comparer les débits de la pompe et ceux estimés par l'algorithme de corrélation pour connaître la précision des calculs.

Le prochain chapitre présentera les résultats des diverses expérimentations. Le protocole expérimental décrit les manipulations permettant l'étude de la stabilité du modèle *in vitro*, de la précision des vitesses calculées et des conséquences de la profondeur de corrélation sur la précision des calculs de déplacement.

CHAPITRE 4

VALIDATION EXPÉRIMENTALE

Ce chapitre est divisé en cinq parties, soit le protocole expérimental, l'étude de la stabilité du modèle *in vitro*, l'étude de l'influence de la position du plan focal sur la précision des calculs de vitesses, l'étude des effets de la profondeur de corrélation et finalement l'étude de la précision de l'algorithme de corrélation.

4.1 Protocole expérimental

La première expérience étudie la stabilité du modèle *in vitro*. Le sang utilisé dans la seringue est préalablement lavé, le taux d'hématocrite est ajusté à 45% et il est ensuite injecté dans le fantôme à un débit constant de 5 $\mu\text{L/h}$. La lumière transmise est utilisée à une intensité maximale soit 150 W. Un filtre gris permet d'augmenter le contraste des images vidéo. Une micro seringue de 10 μL est placée dans le pousse seringue qui est contrôlé par ordinateur. Le plan focal du microscope est ajusté au centre du micro tube. Une séquence de 9 000 images est enregistrée pour montrer les variations instantanées de la vitesse occasionnées par le modèle. La caméra enregistre 1 000 images à la seconde et le temps d'exposition d'une image est de 0,34 ms.

Une seconde expérience étudie l'effet de la position du plan focal sur la précision de l'algorithme de corrélation. Le sang lavé, dont le taux d'hématocrite est de 45%, est injecté dans le fantôme à un débit constant de 5 $\mu\text{L/h}$. La lumière transmise est utilisée à une intensité maximale soit 150 W. Un filtre gris permet d'augmenter le contraste des images vidéo. Une micro seringue de 10 μL est placée dans le pousse seringue qui est contrôlé par ordinateur. Le centre du tube se trouve à 0 μm , les positions au dessus sont négatives et les positions en dessous sont positives. Dix-neuf séquences vidéo sont enregistrées à intervalle de 4 μm pour une plage allant de moins 24 μm à plus 48 μm

pour permettre d'obtenir des images limites semblables. Le planétaire du microscope permet de mesurer la position du plan focal avec une précision de $2\text{ }\mu\text{m}$. Une séquence de 2 000 images est enregistrée pour permettre l'estimation du débit à tous les 250 ms et obtenir un débit moyen pour la durée de l'enregistrement. La caméra enregistre 2 000 images à la seconde et le temps d'exposition d'une image est de 0,34 ms.

La troisième expérience étudie l'effet de la profondeur de corrélation sur le calcul de la vitesse des globules rouges. Les images de synthèse produites par la projection 2D du modèle mathématique d'écoulement sanguin sont utilisées pour comparer la vitesse théorique des globules rouges au centre du tube de $30\text{ }\mu\text{m}$ avec la vitesse des taches sur les images. Le taux d'ensemencement des particules sphériques est de 40% par volume. Une profondeur de corrélation de $23\text{ }\mu\text{m}$ a été utilisée pour la formation des images. Le profil de vitesses que les globules doivent atteindre est une parabole dont la vitesse maximum est $0,4\text{ mm/s}$ ce qui donne un débit de $0,64\text{ }\mu\text{L/h}$ comparable au débit expérimental de $1\text{ }\mu\text{L/h}$. La taille des pixels de l'image correspond à celle de la caméra pour un grossissement de 40X soit $0,18\text{ }\mu\text{m}^2$.

La quatrième expérience a pour but de mesurer la précision des calculs de vitesses en comparant les débits estimés par l'algorithme de corrélation avec les débits du pousse seringue. Deux types de sang sont utilisés pour cette expérience, soit le sang lavé et le sang reconstitué. Le taux d'hématocrite est ajusté à 45% pour les deux types de sang. La lumière transmise est utilisée à une intensité maximale de 150 W. Un filtre gris permet d'augmenter le contraste des images vidéo. Les micro seringues de $10\text{ }\mu\text{L}$ pour le sang lavé et de $2,5\text{ }\mu\text{L}$ pour le sang reconstitué sont placées dans le pousse seringue qui est contrôlé par ordinateur. Le plan focal du microscope est ajusté au centre du micro tube. Cette expérience consiste à faire varier le débit du pousse seringue de 1 à $27\text{ }\mu\text{L/h}$. La plage de débit a été choisie pour obtenir des vitesses similaires aux vitesses physiologiques. Les séquences vidéo sont enregistrées 50 secondes après que le débit ait

été programmé dans la pompe. Une séquence de 2 000 images est enregistrée pour permettre l'estimation du débit à tous les 250 ms et obtenir un débit moyen pour la durée de l'enregistrement. La caméra enregistre 2 000 images à la seconde et le temps d'exposition d'une image est de 0,34 milliseconde.

Le tableau 3 résume les différents paramètres des quatre expériences qui ont été menées pour caractériser l'algorithme soit le nombre d'images par seconde (IPS), le débit (Q), le nombre d'images enregistrées (N image), le taux d'hématocrite du sang dans la seringue (H), la position du plan focal (PF) et le temps de stabilisation du modèle *in vitro* (T stab).

Tableau 3
Récapitulation des paramètres expérimentaux pour les quatre expériences.

	IPS	Q ($\mu\text{L/h}$)	N image	H (%)	PF (μm)	T stab. (s)
Stabilité	1000	5	9000	45	0	60
Plan focal	2000	5	2000	45	-24 à +48	60
PC	2000	0,64	50	40	0	-
Précision	2000	1 à 27	2000	45	0	50

4.2 La stabilité du modèle *in vitro*

La séquence de neuf mille images ayant servi à l'étude de la stabilité du modèle *in vitro* montre bien les fluctuations du débit qui peuvent survenir. La figure 33 représente une moyenne déroulante de 50 images pour les neuf secondes d'acquisition de la séquence vidéo. Le débit a été calculé selon la méthode de l'intégrale du profil de vitesses moyen, décrite au chapitre 3.

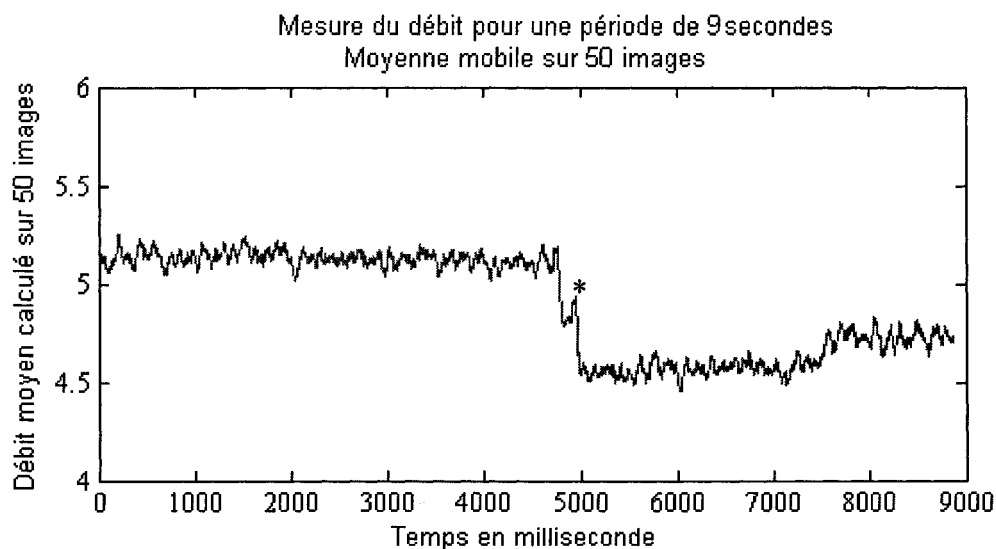


Figure 33 Débit instantané moyenné sur 50 images pour 9 secondes. Un débit de $5 \mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de $30 \mu\text{m}$ a été choisi pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 60 par 60 pixels a été utilisée conjointement à une étampe de 15 par 15 pixels pour le calcul des déplacements. La méthode de l'intégrale du profil de vitesses moyen a été utilisée pour calculer le débit.

La variation abrupte qui apparaît à $t = 4\,800 \text{ ms}$ (voir *) ne trouve d'explication que dans un blocage partiel de la seringue ou du modèle. Lorsque l'on regarde les petites fluctuations sur une longue période de temps, de 0 à $4\,000 \text{ ms}$, le débit varie de $5,01$ à $5,25 \mu\text{L/h}$. Ces valeurs représentent moins de 2,5% d'erreur sur la valeur moyenne qui est de $5,13 \mu\text{L/h}$ pour cette période.

4.3 L'influence du plan focal sur la précision du calcul des vitesses

Une expérience a été menée pour observer l'influence de la mise au point du microscope sur l'estimation des débits. Un débit constant de $5 \mu\text{L/h}$ fait circuler le sang lavé dans le modèle pendant que les séquences sont enregistrées pour différentes positions du plan focal. Typiquement, une plage de $72 \mu\text{m}$ est parcourue par saut de $4 \mu\text{m}$. La figure 34 présente le débit estimé par la méthode de l'intégrale du profil des vitesses moyen pour

les différentes positions du plan focal. La position zéro correspond physiquement au centre du tube représenté par le cercle vert. À gauche se trouve le dessus du tube désigné par le microscope et à droite se situe le bas du tube désigné par la lumière (soleil). Les données avec des * semblent avoir été prises lors d'une instabilité dans le modèle *in vitro*. Lors du visionnement des séquences vidéo on remarque que les taches pour les séquences à 0 et 8 μm vont plus vite que sur les autres séquences. Ces variations ne sont donc pas dues à la position du plan focal, mais bien à un mauvais fonctionnement du modèle *in vitro*.

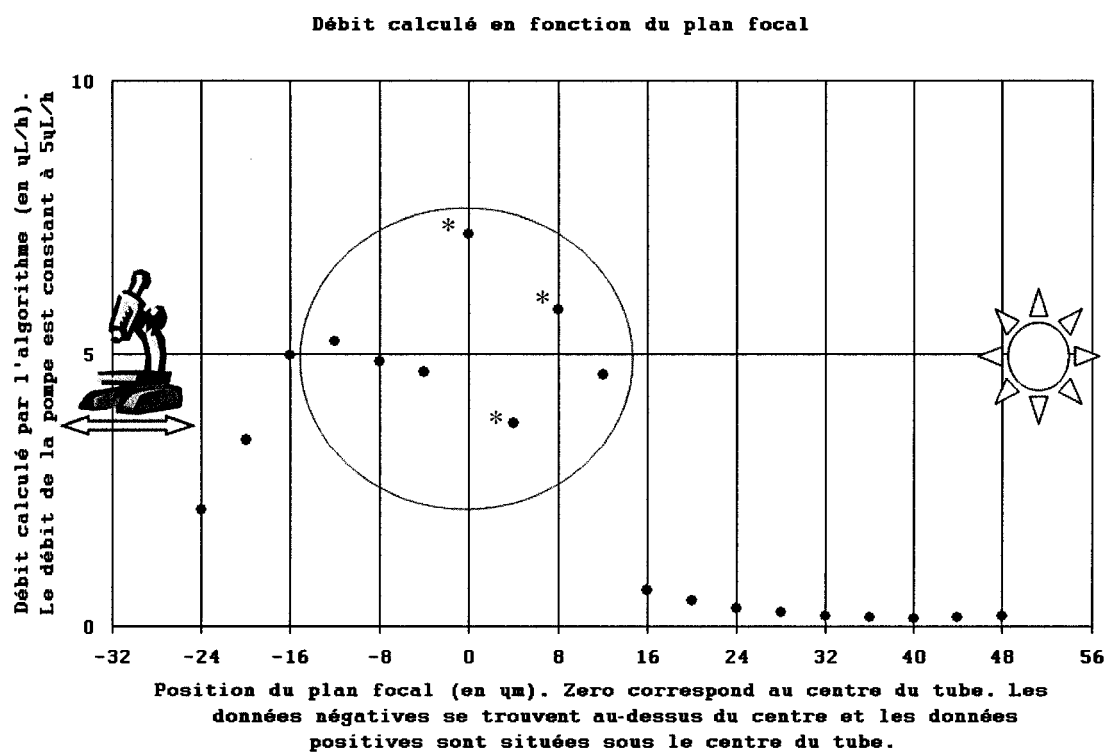


Figure 34 Estimés du débit en fonction de la position du plan focal dans le micro tube. Un débit de $5\mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de $30\mu\text{m}$ a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Une fenêtre de 60 par 60 pixels a été choisie conjointement à une étampe de 15 par 15 pixels pour le calcul des déplacements. La méthode de l'intégrale du profil de vitesses moyen a été utilisée pour calculer le débit.

Dans les faits, il n'est pas facile de s'assurer de la position centrale du plan focal. Cela dépend des observateurs, de l'éclairage de la scène et de la forme du modèle *in vitro*. La figure 35 montre quelques images provenant des différents plans focaux utilisés lors de cette expérience. L'image du centre a été choisie selon des critères de contraste et de netteté. Comme la position de la platine du microscope n'est pas calibrée, le plan focal choisi pour les mesures varie un peu d'une expérience à l'autre. Pour cette raison, lors de toutes les expériences suivantes, le plan focal a été ajusté aux environs de $+12\text{ }\mu\text{m}$. Cette position a la particularité de présenter deux fines bandes noires parallèles à la lumière du tube sur les images de microscopie, elle est donc facilement repérable parmi les autres (figure 34 $+12\text{ }\mu\text{m}$).

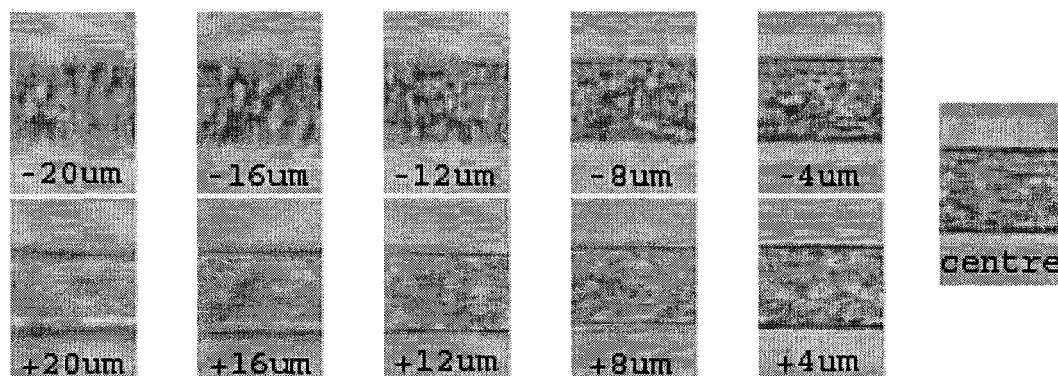


Figure 35 Images des séquences vidéo à différents plans focaux. Un débit de $5\mu\text{L/h}$ de sang lavé à 45% d'hématocrite dans un microtube de $30\text{ }\mu\text{m}$ a été utilisé pour créer les images *in vitro*. Les valeurs négatives signifient que les images ont été prises au-dessus du centre du tube et les images aux valeurs positives ont été prises sous le centre du tube.

Ces bandes noires sont dues à la diffraction des rayons lumineux lorsque ceux-ci changent de milieu. L'indice du sang, de la réfraction de l'eau ainsi que celui de la vitre dont est fabriqué le tube sont tous différents. L'équation 4.3 montre la relation entre l'angle d'incidence θ_i et l'angle de la lumière transmise θ_t en fonction de l'indice de réfraction N_i et N_t des deux milieux telle qu'énoncé par Willebrord Snell (Davidson 2004). Selon cette loi, plus l'angle d'incidence de la lumière est grand lorsqu'elle

traverse une interface entre deux milieux différents et plus l'angle de la lumière transmise sera grand. Il est donc normal d'observer des aberrances près des parois, car l'angle d'incidence des rayons lumineux avec le sang est plus grand à cet endroit.

$$N_i * \sin(\theta_i) = N_t * \sin(\theta_t) \quad (4.3)$$

4.4 Étude de la profondeur de corrélation

Les images de synthèse produites par simulation mathématique permettent de connaître les profils réels de l'écoulement pour tous les plans focaux. L'algorithme de corrélation a été appliqué à la séquence d'images et le profil calculé est présenté en noir sur la figure 36. Le profil théorique, en vert, représente la force utilisée pour calculer les déplacements des globules rouges. Le profil moyen des vitesses réel des sphères au centre du tube pour la durée de la simulation (croix rouges) est tracé sur la même figure. Le fait que ces deux profils soient superposés montre que la simulation a bien fonctionné. Les vitesses moyennes résultant d'une projection 2D des sphères sont représentées par des points bleus. Ces vitesses représentent la moyenne des vitesses du centre des sphères pondérée par une gaussienne pour simuler la profondeur de corrélation. Le profil de vitesses calculé par l'algorithme de corrélation avec une fenêtre de 60 par 60 pixels et une étampe de 15 par 15 pixels est représenté en noir. Ce profil représente la vitesse des taches sur les images de synthèse créées par la projection 2D. Les traits verticaux magenta montrent les limites de l'écoulement simulé par le modèle.

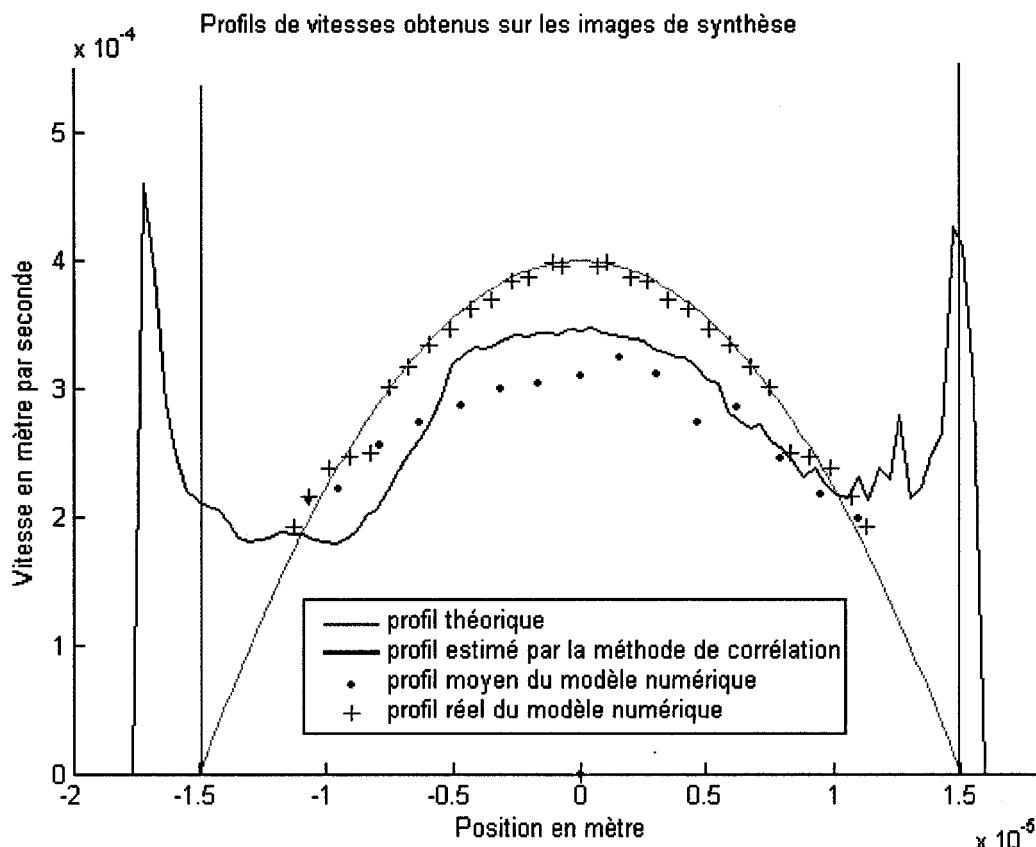


Figure 36 Profils de vitesses obtenus sur les images de synthèse par simulation et par l'algorithme de corrélation. En vert, le profil théorique; les croix rouges illustrent le profil de vitesses réel des sphères pour le plan central; les points bleus la vitesse moyenne du centre des sphères selon la projection 2D pour une profondeur de champ de $23\text{ }\mu\text{m}$. La ligne noire représente le profil de vitesses moyen calculé par l'algorithme de corrélation. Les deux traits verticaux représentent les limites du tube.

Le profil moyen, points bleus, montre que la mesure des vitesses au centre du tube est plus affectée par la profondeur de corrélation que les vitesses périphériques. C'est ce qui avait été prédit de façon théorique au paragraphe 2.5.1. Le profil de vitesses moyen obtenu par l'algorithme de corrélation, en noir, montre aussi les effets de la profondeur de corrélation puisqu'il sous-estime aussi les vitesses. Comme l'algorithme de

corrélation mesure les vitesses des taches plutôt que celles du centre des sphères, il est normal que les résultats soient différents du profil moyen du modèle numérique.

4.5 La précision de l'algorithme de corrélation

Les profils de vitesses représentent l'écoulement dans le modèle *in vitro*. Deux façons d'estimer le débit instantané dans le micro tube ont été retenues. En faisant varier le débit sanguin dans le tube, il est donc possible d'évaluer indirectement la précision de l'algorithme de corrélation et de valider les vitesses qu'il calcule.

La figure 37 présente les débits moyens estimés à partir des séquences vidéo pour chaque débit de la pompe. Chaque débit moyen représente le débit estimé pour cinq séries de 50 images extraites de la séquence de 2 000 images. Les débits obtenus par la multiplication de la vitesse moyenne par l'aire du tube sont illustrés par les losanges bleus. Les débits estimés par l'intégration du profil de vitesses moyen sont désignés par les carrés verts. Les lignes verticales représentent les écarts types entre les cinq débits estimés. Les lignes diagonales représentent une régression linéaire des débits moyens de l'ensemble des mesures pour chaque méthode. L'équation de ces droites ainsi que leur coefficient de détermination sont donnés dans les encadrés.

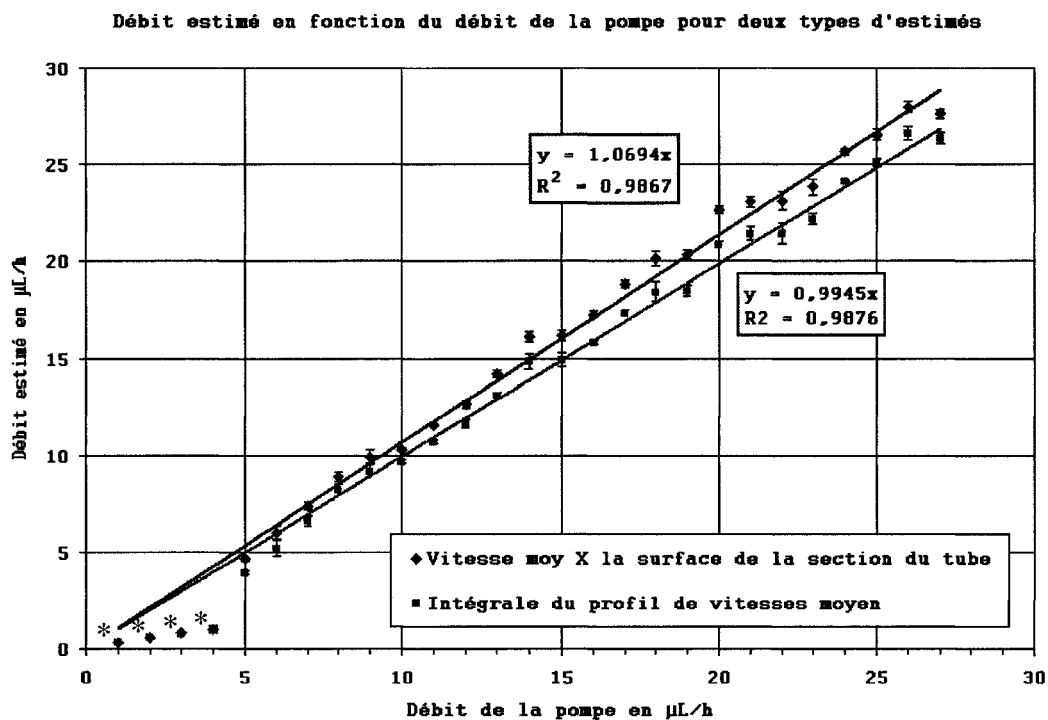


Figure 37 Graphique des débits estimés en fonction du débit de la pompe. Les points représentent la moyenne de cinq débits estimés pour chaque débit de la pompe. Les lignes diagonales illustrent une régression linéaire des débits moyens de l'ensemble des mesures pour chaque méthode. Le sang lavé à 45% d'hématocrite a été utilisé pour simuler un écoulement sanguin dans un tube de 30 μm de diamètre. Les déplacements ont été calculés par l'algorithme de corrélation. La fenêtre utilisée faisait 60 par 60 pixels et l'étampe 15 par 15 pixels. Des filtres moyennés et temporels ont été utilisés tel que décrit au chapitre 3.2.3.

Malgré le bon fonctionnement du modèle *in vitro*, les données obtenues pour les débits de 1 à 4 $\mu\text{L/h}$ (voir les données avec des *) semblent être faussées par une mauvaise utilisation du pousse seringue. Comme ce sont les quatre premiers débits qui ont été affectés, il est possible que le curseur du pousse seringue n'ait pas encore été bien calé sur le piston de la seringue. Ces données sont tout de même présentées sur cette figure puisque aucun motif valable ne nous permet de les soustraire à l'analyse.

Les droites obtenues par la régression linéaire représentent le comportement de la méthode d'estimation du débit. Pour la méthode de l'intégrale du profil moyen, la pente de la droite montre que les débits sont sous-estimés de 1%. Pour la méthode de la vitesse moyenne, les débits sont surestimés de 7%.

Les petits écarts types montrent que le modèle *in vitro* a été stable pendant tous les débits mesurés et qu'il n'y a pas eu de blocage momentané. Les coefficients de variations des débits estimés par la méthode d'intégration du profil de vitesses moyen et par la méthode de la vitesse moyenne sont contenus dans un intervalle allant de 0,3 à 7,6% et 0,4 à 5,8% respectivement. Le coefficient de variation moyen pour les deux méthodes, 2,3 et 1,7%, montre que la courbe de régression linéaire est représentative de tous les débits estimés.

Les deux méthodes d'estimation du débit ayant utilisé les mêmes profils de vitesses moyens, la différence entre les résultats est donc uniquement dépendante de la méthode utilisée pour estimer le débit.

4.5.1 Expérience avec du sang complet

Une expérience similaire a été effectuée en utilisant du sang complet. Le même montage *in vitro* est utilisé pour réaliser les acquisitions d'images à l'exception de la seringue qui a été remplacée par une seringue semblable de plus petit volume, 2,5 μL puisque la précédente a été endommagée. Les mesures de tous les débits n'ont donc pas été prises lors de cette expérience puisque le volume de sang n'était pas suffisant. Néanmoins, les données permettent de tracer la tendance et de constater que les deux préparations de sang réagissent de façon semblable.

La figure 38 montre les débits estimés par la méthode d'intégration du profil de vitesses moyen pour les deux préparations de sang. Les données obtenues avec du sang complet sont représentées par les losanges rouges alors que les données de l'expérience précédente avec du sang lavé sont représentées par les carrés verts. Les lignes verticales illustrent les écarts types entre les cinq débits estimés. Les lignes diagonales représentent une régression linéaire des débits moyens de l'ensemble des mesures pour chaque méthode. L'équation de ces droites ainsi que leur coefficient de détermination sont donnés dans les encadrés.

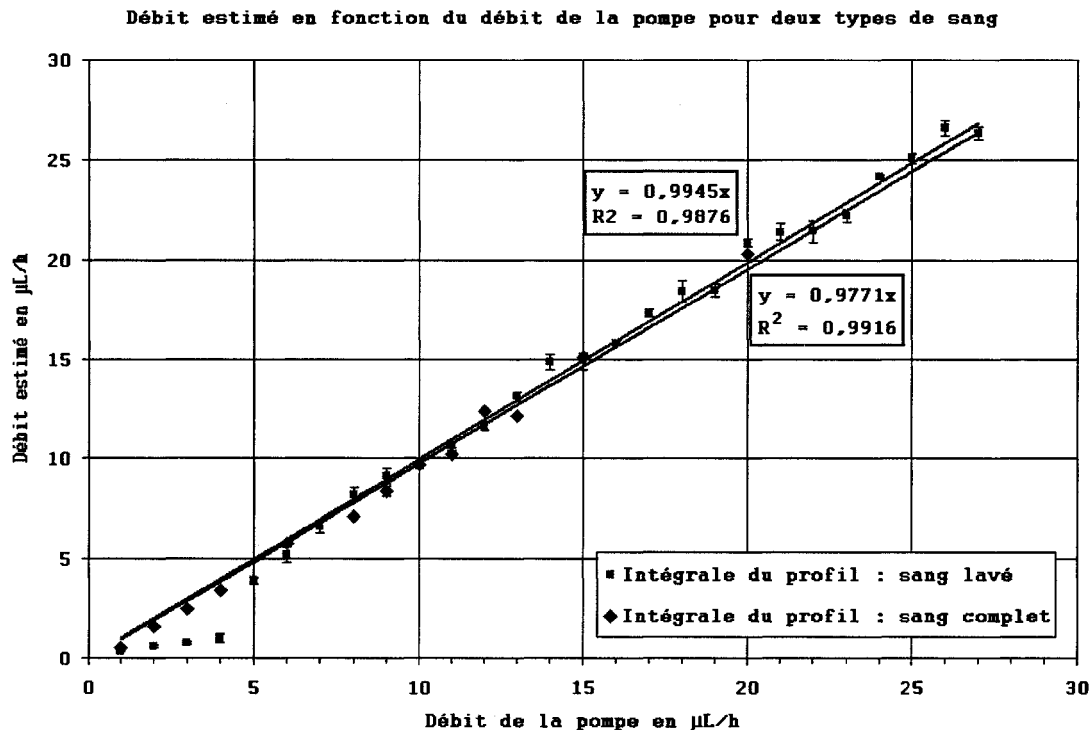


Figure 38 Débit estimé en fonction du débit de la pompe pour du sang complet et du sang lavé. Le sang lavé et le sang complet à 45% d'hématocrite ont été utilisés pour simuler un écoulement sanguin dans un tube de 30 μm de diamètre. Les déplacements ont été calculés par l'algorithme de corrélation. La fenêtre utilisée faisait 60 par 60 pixels et l'étampe 15 par 15 pixels. Les filtres spatial et temporels ont été utilisés tel que décrit au chapitre 3.2.3.

On remarque que cette expérience a permis de bien mesurer les débits de 1 à 4 $\mu\text{L/h}$. Cette expérience montre aussi que la précision demeure la même pour de faibles et de grands débits. La pente de la droite pour le sang complet montre que les débits sont sous-estimés de 2%. Les petits écarts types montrent que le modèle *in vitro* a été stable pour tous les débits mesurés et qu'il n'y a pas eu de blocage momentané. Le coefficient de variation moyen des débits estimés par la méthode d'intégration du profil de vitesse moyen est de 2,2%, tous les coefficients sont compris dans l'intervalle 0,6% à 5,6%. Comme les données du sang lavé sont similaires aux données du sang complet, on peut conclure que cette méthode est aussi précise pour les deux types de sang.

4.5.2 Débits estimés en fonction des dimensions de la fenêtre

Le graphique de la figure 39 montre les débits sanguins estimés par l'algorithme de corrélation en utilisant deux fenêtres de dimensions différentes. Les carrés rouges présentent les débits estimés par la méthode retenue. Les cercles bleus représentent la même méthode utilisée avec une fenêtre de 22 pixels carrés plutôt que de 60 pixels carrés. La courbe de tendance bleue montre bien que lorsque la fenêtre est plus petite, les vitesses maximales qui peuvent être détectées sont plus petites. Les différences entre les débits estimés par les deux méthodes ne sont pas très grandes pour les débits plus petits que 6 $\mu\text{L/h}$. La taille des étampes et la segmentation des limites du tube pourrait être la cause de ces petites différences.

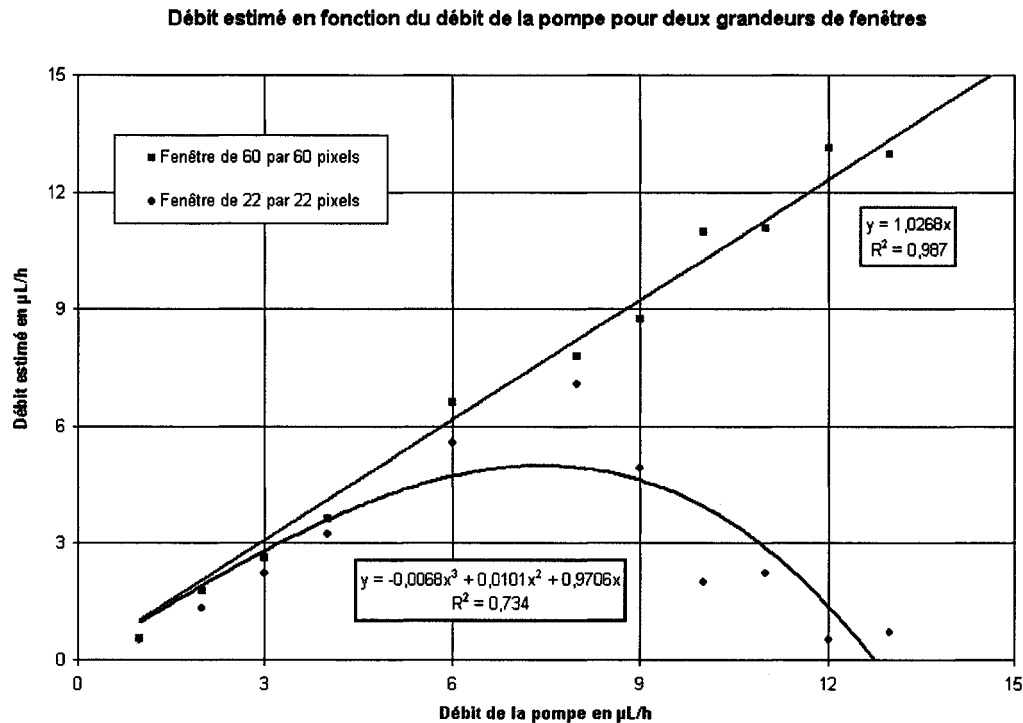


Figure 39 Estimé des débits pour deux grandeurs de fenêtres sur les images de circulation *in vitro* avec du sang complet à 45 % d'hématocrite pour différents débits de la pompe. La courbe verte reprend les résultats précédents obtenus par l'utilisation d'une fenêtre de 60 par 60 pixels et d'une étampe de 15 par 15 pixels. La courbe noire montre les débits estimés par une fenêtre de 22 par 22 pixels et une étampe de 11 par 11 pixels. On remarque que pour un débit supérieur à 6 $\mu\text{L/h}$, l'estimation n'est plus juste lorsque la fenêtre utilisée est petite.

4.6 Synthèse du chapitre quatre

Dans ce chapitre qui décrit les résultats expérimentaux, les étapes du protocole expérimental ont été présentées. Chaque expérience a permis d'étudier les différents aspects du projet, soit le modèle *in vitro*, la profondeur de corrélation et la précision de l'algorithme de corrélation.

La première expérience fait ressortir les faiblesses du modèle *in vitro* sur le plan de la constance du débit dans le temps. Cette caractéristique avait été constatée par les tests préliminaires faits sur le pousse seringue lors de la conception du modèle *in vitro*, chapitre 2.4.1.

L'effet de la profondeur de corrélation est bien visible lorsqu'on estime le débit pour divers plans focaux du modèle *in vitro*. Cette seconde expérience montre que la précision de l'algorithme change peu pour les positions du plan focal comprises dans un intervalle de plus et moins 12 μm du centre du tube. L'utilisation d'images de synthèse démontre que l'algorithme calcule bien la vitesse des taches présentes sur les images. Cependant, il convient de reconnaître que les taches au centre de l'écoulement se déplacent moins vite que les globules rouges lorsque le profil du flux sanguin est parabolique. Ce phénomène augmente les erreurs de mesure sur les vitesses calculées au centre du tube. Le débit estimé pourrait donc être une sous-estimation du débit réel.

La troisième expérience utilise le modèle *in vitro* pour mesurer la précision de l'algorithme de corrélation. Les résultats indiquent que l'erreur de l'algorithme de corrélation, pour des débits allant de 1 à 27 $\mu\text{L/h}$, est d'environ 1%. De plus, cette expérience a montré que la méthode d'estimation du débit la plus juste est celle basée sur l'intégrale du profil de vitesses moyen.

L'expérience avec du sang complet atteste que la microscopie intravitale sera compatible avec le traitement des images puisque des résultats similaires ont été rapportés pour les deux types de sang.

Le chapitre suivant fait l'analyse des résultats. Cette analyse permet d'expliquer les phénomènes observés. Elle met aussi les résultats obtenus en perspective avec les travaux des autres groupes de recherche.

CHAPITRE 5

ANALYSE DES RÉSULTATS

Ce chapitre présente l'analyse détaillée des résultats et une critique du travail effectué en regard des résultats obtenus dans d'autres laboratoires de recherche.

5.1 Le modèle *in vitro*

Le modèle *in vitro* ressemble beaucoup aux modèles adoptés par d'autres laboratoires. Le choix du diamètre était restreint par les dimensions de micro tubes disponibles. Un diamètre de 30 μm est une bonne dimension pour étudier la microcirculation. Cependant, l'étude de la profondeur de corrélation a démontré que les résultats seraient affectés par la profondeur de corrélation. Pour limiter les effets de la profondeur de corrélation, il aurait mieux fallu utiliser des tubes plus gros, par exemple 60 μm . Les dimensions utilisées par les autres groupes sont généralement plus grandes et les sections varient de rectangulaire, 30 X 300 μm (Meinhart, Wereley et al. 1999), à circulaire, 236 μm de diamètre (Koutsiaris, Mathioulakis et al. 1999), en passant par des section biconcaves de 28 X 360 μm (Bitsch, Olesen et al. 2005) et semi-circulaires de 100 μm de diamètre (Satake, Kunugi et al. 2005). L'originalité de ce travail réside dans le fait qu'aucun compromis sur la réalisation d'images réalistes n'a été fait afin d'augmenter la précision des calculs de vitesses.

5.1.1 La taille des marqueurs

La grande taille des particules est très limitative en vélocimétrie par imagerie de particules (PIV). La taille des particules utilisées dans la littérature varie de 200 nanomètres (Meinhart, Wereley et al. 1999) à 1 μm (Satake, Kunugi et al. 2005). Comme la plupart des études portent sur la précision des algorithmes, on comprend bien

pourquoi peu de groupes de recherche utilisent des globules comme marqueur. De plus, le problème est complexifié par la non-sphéricité des globules rouges. Les globules biconcaves ne projettent pas toujours la même surface lors de l'enregistrement vidéo.

Quelques groupes s'intéressant à la microcirculation sanguine utilisent néanmoins les globules rouges. Certains groupes de recherche utilisent le suivi de particules pour l'étude de la circulation sanguine dans les capillaires puisque les globules rouges sont distinguables entre eux à cette échelle (Koutsiaris and Pogiati 2004; Kim, Popel et al. 2005; Jeong, Sugii et al. 2006). Le suivi de particules peut aussi être appliqué à des images de fluoroscopie (Ishikawa, Sekizuka et al. 1998; Parthasarathi, Japee et al. 1999; Bishop, Nance et al. 2001; Smith, Long et al. 2003; Sugii, Okuda et al. 2005), ou encore à des images enregistrées pour un écoulement sanguin ayant un taux d'hématocrite réduit (Lominadze and McHedlishvili 1999; Bishop, Nance et al. 2004; Sugii, Okuda et al. 2005). La méthode du suivi de particules est moins sensible à la taille des particules, mais il n'est pas toujours possible de l'utiliser.

La méthode de la corrélation croisée retenue dans cette étude a été appliquée à des images *in vitro* représentant un écoulement sanguin physiologique. D'autres études *in vitro* et *in vivo* utilisent les mêmes méthodes de corrélation croisée pour mesurer les déplacements sans modifier la microcirculation de quelque façon que ce soit (Umetani, Yuzawa et al. 1989; Tsukada, Minamitani et al. 1996; Tsukada, Minamitani et al. 2000; Sugii, Nishio et al. 2002; Nakano 2003; Bitsch, Olesen et al. 2005). Ces études montrent qu'il est possible de mesurer la vitesse des globules rouges malgré la taille des marqueurs. En utilisant des images de synthèse fidèles à celles obtenues lors d'écoulements sanguins, Tsukada et al. ont estimé que les vitesses calculées à l'aide de leur algorithme de corrélation croisée correspondaient à 99% de la vitesse réelle (Tsukada, Minamitani et al. 2000).

5.1.2 Le taux d'ensemencement

Le taux d'hématocrite du sang utilisé pour les expériences a été ajusté à 45% afin d'obtenir des images similaires aux images de microscopie intravitale. Ceci entraîne un taux d'hématocrite anormalement élevé dans les micro tubes, soit environ 37%. En comparaison le taux d'hématocrite dans des artérioles de même diamètre est d'environ 15%, figure 40.

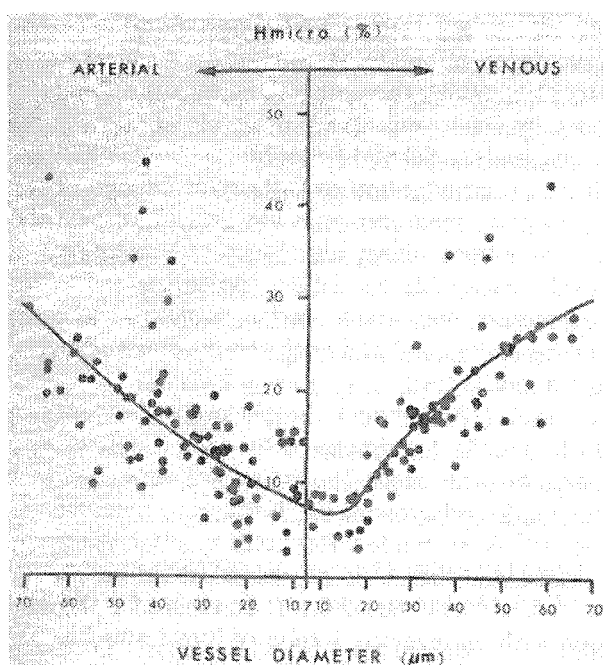


Figure 40 Taux d'hématocrite dans la microcirculation en fonction du diamètre des vaisseaux (Fung 1993).

Les multiples bifurcations présente dans l'organisme font diminuer le taux d'hématocrite dans les micro vaisseaux. Or dans le modèle *in vitro* il n'y a pas de bifurcation ce qui explique pourquoi le taux d'hématocrite demeure plus élevé que dans la microcirculation. Ce taux anormalement élevé pour des micro vaisseaux pourrait expliquer en partie la forme aplatie des profils de vitesses calculés par l'algorithme, voir figure 26 en rouge.

Bishop et Johnson ont filmé les globules rouges dans des veinules de 38 μm chez un rat (figure 41) (Bishop, Nance et al. 2004). Leurs modèles présentent des symptômes d'hyperagrégation et le taux d'hématocrite systémique a été diminué de moitié pour permettre l'observation des agrégats. Cette figure montre bien que les images permettant de distinguer chaque globule rouge représentent des écoulements ayant un taux d'hématocrite anormalement bas.

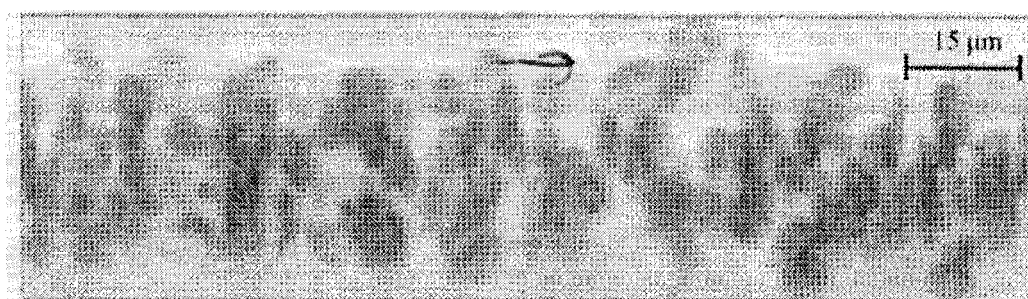


Figure 41 Image *in vivo* de microcirculation sanguine dans une veinule de 38 μm chez un rat dont le sang, traité au Dextran, présente un taux d'hématocrite systémique de 19%. La flèche indique la direction du flux (Bishop, Nance et al. 2001).

De tous les articles scientifiques consultés, c'est la première fois que les images produites par un modèle *in vitro* ressemblent aux images d'une circulation physiologique. Cette propriété du modèle *in vitro* permet de caractériser l'algorithme de corrélation sur des images réalistes plutôt que sur des images optimisées pour augmenter la précision des vecteurs vitesses calculés.

5.1.3 Les vitesses

Rares sont les groupes de recherche ayant démontré la fiabilité de leurs algorithmes pour des vitesses aussi élevées que 12,5 mm/s. Les vitesses maximales mesurées par d'autres groupes sont 3 mm/s (Sugii, Okuda et al. 2005), 4,8 mm/s (Koutsiaris and Pogiati 2004), 8 mm/s (Sugii, Nishio et al. 2002) et 16 mm/s. (Bitsch, Olesen et al. 2005).

Lorsque l'on met ces résultats en relation avec la taille des vaisseaux, peu d'entre eux présentent des vitesses physiologiques puisqu'ils n'étudient pas tous la microcirculation sanguine.

Lors des expériences à 26 $\mu\text{L/h}$, la vitesse maximale calculée a été de 12,5 mm/s. La figure 42 présente les vitesses moyennes et les pressions moyennes dans la microcirculation du chat. Pour des artérioles de 30 μm de diamètre, la vitesse illustrée par la courbe est de 11,5 mm/s. Pour des veinules de même taille, la vitesse est inférieure à 4 mm/s. Il est donc possible de reproduire des vitesses physiologiques d'artérioles lorsque le modèle est utilisé avec de grands débits.

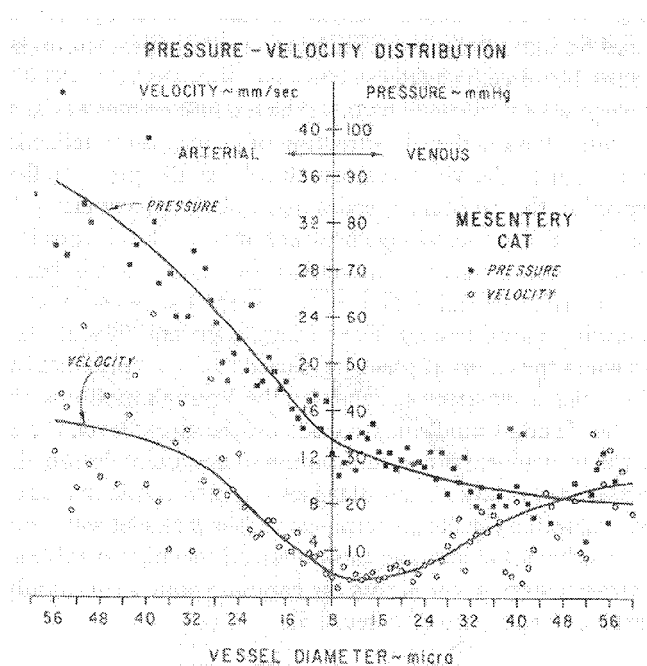


Figure 42 Graphique de la vitesse moyenne et de la pression moyenne en fonction de la dimension des vaisseaux dans la microcirculation (Fung 1993) .

5.1.4 La stabilité du modèle *in vitro*

Il est difficile de savoir si les petites fluctuations dans l'estimé du débit proviennent du modèle *in vitro* ou de l'algorithme. Les expériences préliminaires sur la stabilité du pousse seringue montrent les variations instantanées du pousse seringue à vide, auxquelles viennent s'ajouter plusieurs autres phénomènes. La résistance causée par le frottement du piston sur le corps de la seringue peut varier selon la position du piston. Si le piston et la seringue sont mal nettoyés ou encore si le piston a flambé lors de l'expérience, il y aura alors de petites variations spontanées.

Finalement, la précision du pousse seringue et de la micro seringue elle-même sont garanties pour de grands volumes. C'est-à-dire que la précision d'une seringue de 10 μL est de 0,1 μL lorsque celle-ci est remplie et la précision du pousse seringue pour un débit programmé de 15 $\mu\text{L/h}$ est de 0,15 $\mu\text{L/h}$ lorsque le volume pompé correspond à celui de la seringue. Étant donné le caractère instantané des débits estimés, la variance temporelle est considérée comme normale.

Les séquences *in vivo* présentent parfois des ralentissements spontanés du flux sanguin dans la microcirculation. Le fait que le modèle présente quelques irrégularités dans la constance du débit peut être vu comme une propriété physiologique. Cela permet en outre de constater la grande sensibilité de l'algorithme de corrélation.

Embury et al. ont utilisé des souris pathologiques, plus précisément des souris drépanocytaires, pour étudier les désordres microcirculatoires *in vivo* (Embury, Mohandas et al. 1999). Leurs calculs de la vitesse moyenne des globules rouges ont permis de départager le groupe contrôle du groupe de souris pathologiques. Tel qu'énoncé dans l'introduction, il serait intéressant d'étudier les fluctuations du débit chez des souris bêta thalassémiques à l'aide de l'estimé du débit fait à partir d'images

in vivo. Les fluctuations du débit seraient peut-être un bon outil pour différencier ces groupes de souris et ainsi mieux comprendre les symptômes de cette maladie.

5.1.5 La précision du modèle *in vitro*

La précision d'un dispositif étalon doit être plus grande que la précision de la mesure qui doit être calibrée. Lors de la conception du modèle, tous les moyens techniques ont été mis en œuvre pour obtenir la plus grande précision possible. Le modèle semble un bon amalgame de technologies pour valider l'algorithme de corrélation qui sera utilisé en microscopie intravitale.

Puisque aucun débitmètre n'est adapté à la mesure de si petits débits en continu, la précision intrinsèque du modèle de microcirculation sanguine n'est pas facile à déterminer. Les variations observées expérimentalement au chapitre 4.2 montrent que la stabilité du débit fourni par la pompe demeure sa faiblesse principale. Le débit moyen mesuré lors de cette expérience était de 5,13 $\mu\text{L/h}$ ce qui démontre une précision relative de 2,6%. Il se pourrait donc que l'estimé du débit fait par l'algorithme soit plus précis que le débit programmé dans la pompe. Lors de la validation de l'algorithme de corrélation, la précision des débits estimés est proportionnelle à celle du modèle *in vitro* et à celle de l'algorithme de corrélation.

Pour s'assurer qu'aucun blocage n'a eu lieu durant l'expérimentation, 5 débits ont été calculés pour chaque séquence d'images. L'écart type entre les 5 débits peut alors servir à éliminer les séquences où il y a eu de grandes variations de débit durant l'acquisition des images. L'écart type moyen pour les 27 débits mesurés lors de la validation de l'algorithme de corrélation est de 0,26 μL , ce qui démontre le bon fonctionnement général du modèle durant les expériences.

5.2 Le plan focal

Les débits estimés pour les positions 0, 4 et 8 μm de la figure 34 (voir les données avec des *) sont très différents du débit programmé dans le pousse seringue. Cette oscillation du débit, qui passe successivement de 7 à 3,5 puis à 6 $\mu\text{L/h}$ avant de se stabiliser à 5 $\mu\text{L/h}$, est caractéristique d'un blocage dans le micro tube. Lorsque l'on observe les séquences vidéo, on remarque que la vitesse des globules rouges est plus rapide pour les positions 0 et 8 μm que pour toutes les autres séquences de l'expérience. Ces fluctuations sont donc dues au modèle *in vitro* plutôt qu'à la position du plan focal.

Si on considère que les débits aux positions 0, 4 et 8 μm sont de 5 $\mu\text{L/h}$, on remarque que la position du plan focal dans le tube influence peu l'estimation du débit. On constate aussi que pour les positions négatives, donc au-dessus du centre du tube, la distance où les débits estimés sont encore justes va au-delà du diamètre du tube.

Ce manque de symétrie dans la profondeur de corrélation pourrait être causé par un dérèglement de la pompe, mais une seconde expérience a donné des résultats similaires. Les images hors foyer présentées à la figure 35 montrent que le flou affecte plus rapidement les images sous le centre du tube. Cette perte de contraste pourrait expliquer pourquoi les débits estimés sont si petits pour cette région. La partie supérieure, quant à elle, présente des taches et des contrastes sur une plus grande distance.

La profondeur de corrélation devrait théoriquement être symétrique selon Meinhart (Meinhart 2000). Cependant, les travaux de Parthasarathi et al. sur la profondeur de corrélation démontrent que la distance des particules par rapport au plan focal influence beaucoup la visibilité des particules (Parthasarathi, Japee et al. 1999). Ces travaux ont été effectués *in vivo* sur des artérioles de 8 à 70 μm de diamètre. Ils en déduisent que l'atténuation, due à l'hémoglobine et au grand taux d'ensemencement (50%), affecte plus rapidement les particules situées sous le plan focal. Cette asymétrie de la

profondeur de corrélation pourrait expliquer la forme abrupte de la courbe présentée à la figure 34 pour les positions positives, donc sous le plan focal.

Tel qu'il a été mentionné précédemment, cette expérience démontre que la vitesse des taches et des globules rouges n'est pas la même. Les taches du flux sanguin qui sont enregistrées par la caméra sont formées non pas par une mince couche de globules rouges se déplaçant au centre du tube, mais bien par tous les globules rouges présents dans la région correspondant à la profondeur de corrélation. Puisque les taches sont formées par un volume de globules rouges dans l'axe optique, leurs vitesses correspondent à la vitesse moyenne des globules rouges présents dans ce volume. Pour cette raison, le profil de vitesses calculé par l'algorithme de corrélation représente la vitesse des taches et sous-estime donc la vitesse des globules rouges.

5.3 Étude de la profondeur de corrélation

L'étude de la profondeur de corrélation faite sur les images de synthèse permet de bien comprendre les mécanismes de formation de l'image. Le profil des vitesses moyennes des globules rouges est plus plat et les vitesses maximums sont moins élevées que le profil réel. Ce phénomène avait été prédit par la démonstration théorique faite au chapitre 2.5.1.

Le phénomène est confirmé par le profil de vitesses calculé par l'algorithme de corrélation croisée qui se trouve à mi-chemin entre le profil réel et le profil des vitesses moyennes du modèle rhéologique numérique proposé à titre de validation. Ce résultat est dû au fait que les vitesses moyennes des globules dans le tube n'ont pas été pondérées en fonction de leur distance par rapport au plan focal. Par contre, les intensités de gris qui ont servi pour calculer les profils de vitesses avec l'algorithme de corrélation sont pondérées par une gaussienne pour répondre au phénomène de la profondeur de corrélation.

Cette expérience démontre que les vitesses calculées par l'algorithme de corrélation représentent bien les vitesses des taches visibles dans l'image. Par contre, la vitesse des globules rouges au centre du tube se trouve sous-estimée, conséquence de l'effet optique de la profondeur de corrélation.

Pour s'affranchir de cette profondeur de corrélation, certains groupes de recherche ont développé des microscopes confocal haute vitesse (Angele, Suzuki et al. 2005; Lima 2006). Les fréquences d'échantillonnage sont pour le moment limitées à 200 Hz, mais les applications de vélocimétrie par imagerie de particules tridimensionnelles seront bientôt possibles.

5.4 L'algorithme de corrélation

L'estimation du débit dans un modèle *in vitro* semble être une bonne idée pour valider la méthode de calcul des déplacements. Cette méthode indirecte n'est sûrement pas la plus précise, mais les résultats sont satisfaisants. Les groupes qui font de la PIV valident généralement leurs résultats en comparant les vitesses obtenues avec les vitesses théoriques. Les résultats de Satake et al. montrent un profil de vitesses très ressemblant au profil théorique dans des demi-tubes de 100 μm (Satake, Kunugi et al. 2005). D'autres estiment le débit à l'aide de la vitesse maximum des particules et de la surface du vaisseau (Embury, Mohandas et al. 1999). Dans le cas présent, il y a une grande différence entre les profils théoriques et ceux calculés par l'algorithme. La validation la mieux adaptée est donc l'estimation du débit puisqu'il prend en compte les vitesses pour toute la largeur du tube.

5.4.1 Analyse des deux méthodes d'estimations du débit

Les manipulations effectuées lors de la validation de l'algorithme de corrélation démontrent que l'estimé des débits calculés par l'intégrale du profil de vitesses moyen

Cette expérience démontre que les vitesses calculées par l'algorithme de corrélation représentent bien les vitesses des taches visibles dans l'image. Par contre, la vitesse des globules rouges au centre du tube se trouve sous-estimée, conséquence de l'effet optique de la profondeur de corrélation.

Pour s'affranchir de cette profondeur de corrélation, certains groupes de recherche ont développé des microscopes confocal haute vitesse (Angele, Suzuki et al. 2005; Lima 2006). Les fréquences d'échantillonnage sont pour le moment limitées à 200 Hz, mais les applications de vélocimétrie par imagerie de particules tridimensionnelles seront bientôt possibles.

5.4 L'algorithme de corrélation

L'estimation du débit dans un modèle *in vitro* semble être une bonne idée pour valider la méthode de calcul des déplacements. Cette méthode indirecte n'est sûrement pas la plus précise, mais les résultats sont satisfaisants. Les groupes qui font de la PIV valident généralement leurs résultats en comparant les vitesses obtenues avec les vitesses théoriques. Les résultats de Satake et al. montrent un profil de vitesses très ressemblant au profil théorique dans des demi-tubes de 100 μm (Satake, Kunugi et al. 2005). D'autres estiment le débit à l'aide de la vitesse maximum des particules et de la surface du vaisseau (Embury, Mohandas et al. 1999). Dans le cas présent, il y a une grande différence entre les profils théoriques et ceux calculés par l'algorithme. La validation la mieux adaptée est donc l'estimation du débit puisqu'il prend en compte les vitesses pour toute la largeur du tube.

5.4.1 Analyse des deux méthodes d'estimations du débit

Les manipulations effectuées lors de la validation de l'algorithme de corrélation démontrent que l'estimé des débits calculés par l'intégrale du profil de vitesses moyen

concorde avec les débits de la pompe, figure 37. Les données sont représentées par une droite dont la pente est de 0,99, l'erreur moyenne est donc de 1% . Cette droite reproduit bien les débits estimés puisque le coefficient de détermination est de 0,98. Comme une pente de 1 signifie qu'il y a une parfaite correspondance entre les débits de la pompe et les débits estimés, on peut conclure que l'estimation est juste pour toute la plage des débits. De plus, le coefficient de variation moyen des débits estimés est de l'ordre de la constance du modèle *in vitro*, soit 2,3%. Ce qui porte à croire que les variations des débits mesurés sont dues au modèle *in vitro* plus qu'au traitement des images de la microcirculation sanguine.

De la même façon, on peut conclure que la méthode d'estimation du débit par la vitesse moyenne multipliée par la surface de la section du tube surestime de 7% les débits de la pompe. Cette différence entre les deux méthodes s'explique ainsi : la vitesse moyenne accorde le même poids à toutes les vitesses présentes le long du profil alors que l'intégrale circulaire accorde plus d'importance aux vitesses en périphérie puisque le volume que ces vitesses représentent est plus grand que celui des vitesses du centre. Les vitesses moins élevées situées en périphérie ont donc plus de poids dans l'intégrale et contribuent à rétablir le débit estimé à une valeur juste. La méthode de la vitesse moyenne crée systématiquement une surestimation de l'évaluation du débit causée par la forme non parabolique du profil de vitesses moyen. Pour cette raison, seule la méthode de l'intégrale du profil de vitesses moyen est retenue.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer pourquoi l'estimation du débit donne des résultats précis malgré les nombreuses sources d'erreurs énumérées aux chapitres précédents. Tout d'abord, le fait d'intégrer le profil de vitesses moyen constitue en quelque sorte une dernière étape de filtration. Le suréchantillonnage dû au chevauchement total des étampes contribue à augmenter la précision des débits estimés. Les filtres utilisés pour éliminer les vecteurs aberrants ont aussi un grand rôle à jouer dans la précision globale de l'algorithme de corrélation. Les vecteurs de déplacement qui n'ont pas été éliminés

par les filtres sont donc supposés justes et contribuent à la précision globale des résultats.

D'autre part, il ne faudrait pas oublier les effets de la profondeur de corrélation qui sous-estiment la vitesse des globules rouges. La validation qui a été effectuée sur les images de synthèse montre que les vitesses au centre du tube sont les plus affectées par le phénomène de la profondeur de corrélation alors que les vitesses périphériques le sont moins, figure 36. Bien sûr, si le profil de vitesses réel du flux est plat plutôt que parabolique l'effet de la profondeur de corrélation sera moins marqué. De plus, tel que démontré au chapitre 3.3.1, l'estimé du débit par l'intégrale du profil de vitesses moyen accorde plus de poids aux vitesses périphériques. On peut donc présumer que l'effet de la profondeur de corrélation est minimisé lors de l'estimé du débit, mais que les vitesses au centre sont tout de même inférieures à la vitesse des globules rouges. À l'opposé, le moyennage spatial dû à la taille de l'étampe affecte plutôt les vitesses périphériques puisque c'est là que les vitesses contenues dans l'étampe varient le plus rapidement, selon la position le long du rayon si le profil de vitesses est parabolique. Ces phénomènes produisent les profils de vitesses moyens aplatis typiques tels que montrés à la figure 25, en rouge.

Le fait que le profil de vitesses ne soit pas tout à fait parabolique dans le micro tube pourrait donc expliquer la précision des résultats. Plusieurs phénomènes peuvent alors expliquer pourquoi le profil est aplati, par exemple : la longueur du micro tube, le taux d'hématocrite du sang dans le tube, les débits étudiés, la nature du sang utilisé.

5.4.2 Le sang reconstitué versus le sang lavé

L'expérience réalisée avec du sang reconstitué, figure 38, présente les mêmes conclusions que l'expérience faite avec du sang lavé. On remarque que pour du sang reconstitué, la pente est de 0,97 alors que pour du sang lavé la pente est de 0,99. Il n'y a

pas de différence significative entre les deux expériences puisque la précision est moins grande que la différence. Cette constatation est surprenante puisque le sang reconstitué aurait dû présenter des agrégats, et par le fait même modifier les profils de vitesses moyens.

Le calcul du taux de cisaillement moyen théorique, selon les dimensions du modèle *in vitro* et les débits, donne des valeurs élevées. Ceci pourrait expliquer que le sang reconstitué est désagrégé même à de petits débits et se comporte comme du sang lavé. Un taux de 20 s^{-1} est généralement suffisant pour empêcher l'agrégation du sang normal (Fung 1993). Le tableau 4 montre qu'un débit de $1\text{ }\mu\text{L/h}$ est suffisant pour que le sang se désagrège. Il est donc normal d'observer des comportements similaires pour les deux types de sang.

Tableau 4

Tableau des taux de cisaillement moyens en fonction du débit dans le tube.

Débit en $\mu\text{L/h}$	Taux de cisaillement moyen dans le tube en s^{-1}
1	70
5	350
10	700
15	1 050

Lorsque le débit est inférieur à $1\text{ }\mu\text{L/h}$, les séquences vidéo présentent de longs rouleaux qui tournent sur eux-mêmes. La figure 43 montre ces agrégats typiques du sang humain dans le modèle *in vitro* pour un écoulement et un taux d'hématocrite non physiologique.



Figure 43 Image microscopique d'agrégats de sang humain en rouleaux lors d'un écoulement à très faible débit dans le modèle *in vitro*.

5.4.3 La précision de l'algorithme

Les comparaisons avec les autres études qui utilisent du sang sont difficiles, car aucune n'emploie les mêmes paramètres. Par exemple, Sugii et al. mesurent un débit de $99 \mu\text{L/h}$ lorsqu'ils injectent $100 \mu\text{L/h}$ dans un tube de $100 \mu\text{m}$ de diamètre (Sugii, Okamoto et al. 2001). Cette étude utilise des particules de $1 \mu\text{m}$ de diamètre et des globules rouges à 21% d'hématocrite. La caméra enregistre 6 000 images à la seconde en fluorescence. Les vitesses moyennes mesurées dans le tube sont de l'ordre de $3,5 \text{ mm/s}$. Le débit et le taux d'hématocrite de cette expérience ne sont donc pas physiologiques si on se fie aux figures 40 et 42.

Pour notre application, la méthode de l'intégrale du profil de vitesses moyen donne les meilleurs résultats lors de l'estimé du débit. Cette méthode fonctionne pour le sang lavé et pour le sang complet. La taille de la fenêtre convient aux petits et aux grands débits. La précision des calculs de déplacements est dépendante de la surface des particules dans l'image. Les taches formées par l'écoulement sanguin sont énormes en comparaison des images optimales recherchées en PIV. La précision des déplacements

calculés sur la circulation sanguine est donc inférieure à celles obtenues dans des écoulements optimums.

La précision combinée du modèle *in vitro* et de l'estimateur de débit donne un coefficient de variation compris entre 2 et 4%. La précision de l'algorithme une fois converti en déplacement donne 0,6 μm ou 1,5 pixel pour une vitesse de 12 mm/s. Bien que cette précision soit inférieure à celle de 0,1 pixel obtenue lors d'expérience de PIV (Wereley, Santiago et al. 1998; Sugii, Nishio et al. 2000), il est important de rappeler qu'il a été utilisé dans des conditions physiologiques.

5.5 Synthèse du chapitre cinq

Les expériences menées sur le modèle *in vitro* sont concluantes. Elles permettent de constater que le modèle *in vitro* a été fabriqué dans les règles de l'art afin de reproduire des écoulements sanguins les plus physiologiques possible. L'expérience sur la stabilité du modèle *in vitro* montre que les fluctuations du débit dans le temps sont de l'ordre de 2,5%, figure 33. De plus, le débit sanguin estimé par l'intégrale du profil de vitesses moyen concorde avec le débit de la pompe. Le coefficient de variation de l'erreur pour la plage des débits étudiés, soit de 1 à 27 $\mu\text{L/h}$, est compris entre de 0,3 et 7,6%, figure 37. Comme cette mesure tient compte des erreurs de calcul et des erreurs causées par le modèle *in vitro*, il est possible que la précision des vitesses calculées soit encore meilleure. Puisque les images *in vitro* et *in vivo* sont ressemblantes, la précision des calculs de vitesses en microscopie intravitale devrait être comparable.

L'expérience portant sur l'influence du plan focal sur les calculs de vitesses montre qu'en raison de la grande profondeur de corrélation, l'algorithme est peu sensible à la position du plan focal lorsque celui-ci demeure compris dans la lumière du micro tube, figure 34. L'étude de la profondeur de corrélation démontre cependant que les vitesses calculées par l'algorithme sont celles des taches sur les images. Par conséquent, les globules rouges se déplacent plus rapidement que les vitesses calculées par l'algorithme de corrélation.

CONCLUSION

Le but de ce projet d'étude était de concevoir un montage expérimentale et un algorithme de traitement d'image capable de calculer la vitesse des globules rouges dans la microcirculation sanguine à partir d'images de microscopie et de valider les vitesses calculées à l'aide du modèle *in vitro* et d'images de synthèse.

L'originalité de cette étude réside dans le choix d'un taux d'hématocrite élevé et de débits sanguins physiologiques malgré le fait qu'ils diminuent la précision des calculs de vitesses. Cette étude démontre que le sang, utilisé dans des conditions physiologiques, n'est pas le fluide idéal pour le calcul de la vitesse par imagerie de particules.

Les tests réalisés sur les images de synthèse ainsi que sur les images *in vitro* montrent l'influence de la profondeur de corrélation sur la formation de l'image. Ces manipulations prouvent que les taches apparaissant sur les images *in vitro* et *in vivo* se déplacent à une vitesse différente de celle des globules rouges dans le fluide observé.

Cette étude permet de conclure que la corrélation croisée est un outil souple et facilement adaptable aux conditions expérimentales. L'estimé du débit par l'intégrale du profil de vitesses moyen a été comparé au débit de la pompe du modèle *in vitro*. Il a été démontré que le coefficient de variation du débit estimé est de 2 à 4% pour des débits physiologiques allant de 1 à 27 $\mu\text{L/h}$. Cet outil de mesure peut donc être utilisé chez l'animal puisque les images *in vitro* présentent les mêmes caractéristiques que les images de microscopie intravitale. La mesure du débit dans la microcirculation sanguine chez les souris permettra peut-être un jour de mieux comprendre les symptômes de pathologie tels la bêta thalassémie ou le diabète.

Finalement, la conception du modèle *in vitro* aura permis de saisir toute la difficulté de conserver un débit sanguin constant dans un micro tube; on comprend donc pourquoi il faut tout un organisme pour y arriver.

RECOMMANDATIONS

La grande sensibilité et la précision des mesures de débits ayant été démontrées par les diverses expériences de ce travail, l'utilisation de l'algorithme de corrélation est recommandée pour les études *in vivo* futures. Les filtres ayant été optimisés pour fonctionner sur les images *in vitro*, il pourrait s'avérer utile de les modifier pour augmenter leur efficacité sur les images *in vivo*. Les calculs de vitesses pourront donc servir à quantifier les débits micro circulatoires ou à compter les obstructions momentanées lors d'études de microscopie intravitale.

L'étude de la profondeur de corrélation par la conception et l'utilisation d'images de synthèse plus réalistes est aussi recommandée. En outre, une étude de l'influence de la forme du profil de vitesses des globules rouges sur la précision des profils calculés expliquerait peut être pourquoi les mesures *in vitro* sont si précises en dépit de la grande profondeur de corrélation.

Afin de pouvoir quantifier les désordres rhéologiques il serait bon de concevoir de nouveaux algorithmes. Les informations de débit et de vitesses mesurés par la corrélation croisée seraient utilisés pour évaluer les ralentissements et les obstructions du flux sanguin.

Finalement, les démarches menant à la conception d'un modèle de microcirculation *in vitro* qui reproduirait avec précision les bifurcations entre des vaisseaux aux diamètres et aux longueurs physiologiques devraient être poursuivies. Seul un modèle de microcirculation permettrait d'obtenir un taux d'hématocrite physiologique et stable dans les microvaisseaux. Il permettrait aussi de développer et de valider les outils nécessaires à l'étude des désordres micro circulatoires.

ANNEXE A

DESCRIPTION DES FILTRES MIS À L'ÉPREUVE LORS DES TESTS PRÉLIMINAIRES

1. Le Filtre global

Le filtre global prend pour hypothèse que tous les vecteurs dans l'image ont un module similaire. Il utilise la variance des modules de tous les vecteurs de l'image pour rejeter les vecteurs qui sont différents du vecteur médian.

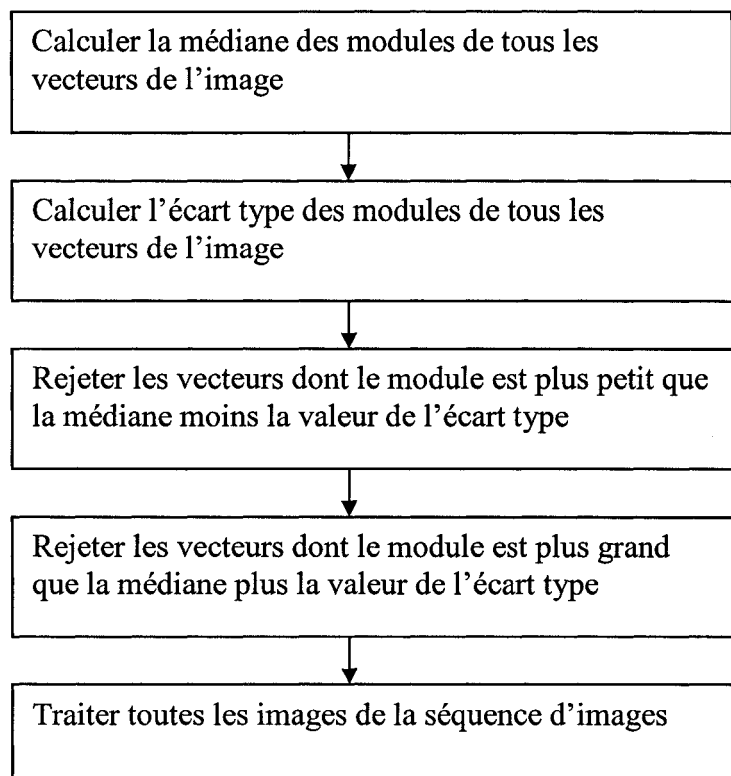


Figure 44 Organigramme du filtre global.

2. Le filtre local

Le filtre local est très simple, il consiste à remplacer la valeur du vecteur qu'on désire filtrer par la moyenne des neuf voisins du vecteur. Ce filtre ne tient pas compte des variations de vitesses normales aux parois du tube.

3. Le filtre moyennneur

Le filtre moyennneur crée un profil de vitesses moyen avec tous les vecteurs de toutes les images de la séquence. Il tient compte de la direction du flux puisque dans cette application les vitesses varient rapidement le long du rayon du tube.

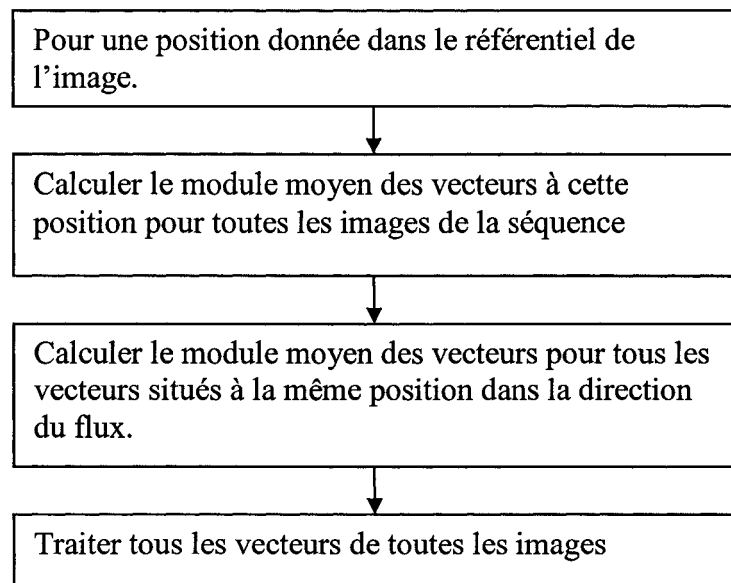


Figure 45 Organigramme du filtre moyennneur.

4. Le filtre temporel

Le filtre temporel est basé sur l'hypothèse que les vitesses sont constantes dans le temps pour une position donnée dans l'image. Il utilise la variance des modules dans le temps pour une position donnée de l'image pour rejeter les vecteurs qui sont différents du vecteur médian.

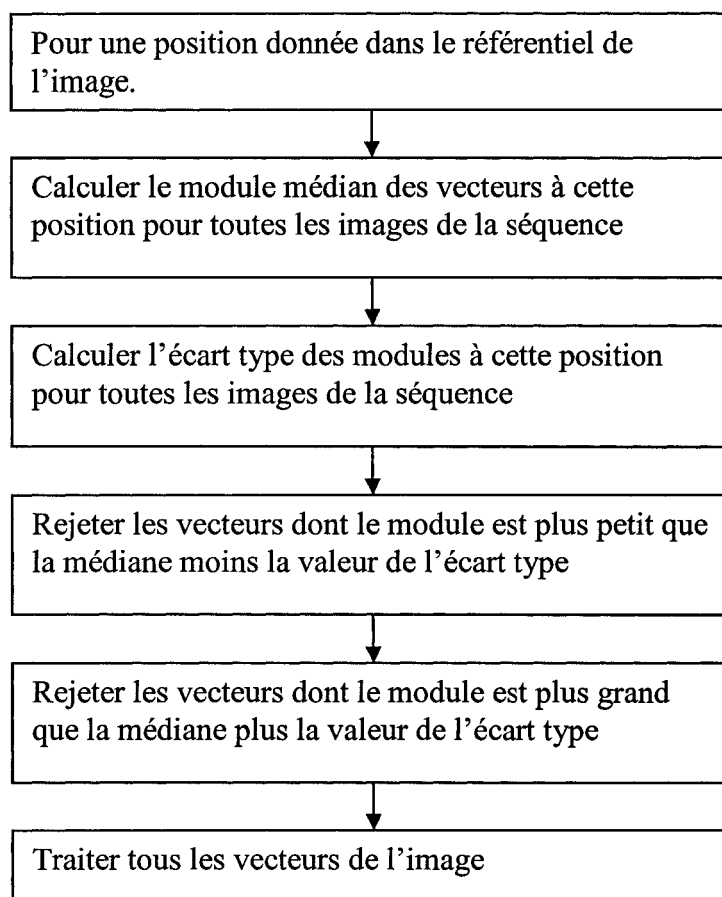


Figure 46 Organigramme du filtre temporel.

ANNEXE B

RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Cette annexe présente les profils de vitesses moyens qui ont servi à estimer le débit pour l'expérience de la quantification de la précision de l'algorithme. L'expérience a été réalisée avec du sang lavé à 45% d'hématocrite dans un tube de 30 μm pour un débit variant de 1 à 27 $\mu\text{L/h}$. Une fenêtre de 60 par 60 pixels et une étampe de 15 par 15 pixels permettent de calculer le profil de vitesses moyen tel que décrit au chapitre 3. La vitesse de la caméra est de 2000 images par seconde.

Les figures 44 à 47 présentent les profils de vitesses moyens pour les débits variant de 1 à 4 $\mu\text{L/h}$. Elles montrent bien que le débit de la pompe n'était pas le bon au début de l'expérience. Les figures 48 à 55 présentent les profils de vitesses moyens pour les débits variant de 5 à 27 $\mu\text{L/h}$. Par esprit de concision, les graphiques sont présentés à tous les 3 $\mu\text{L/h}$. Ces graphiques permettent de bien voir l'évolution des profils de vitesses moyens en fonction du débit dans le micro tube. On remarque aussi que le profil a une légère tendance à s'aplanir au fur et à mesure que le débit sanguin augmente.

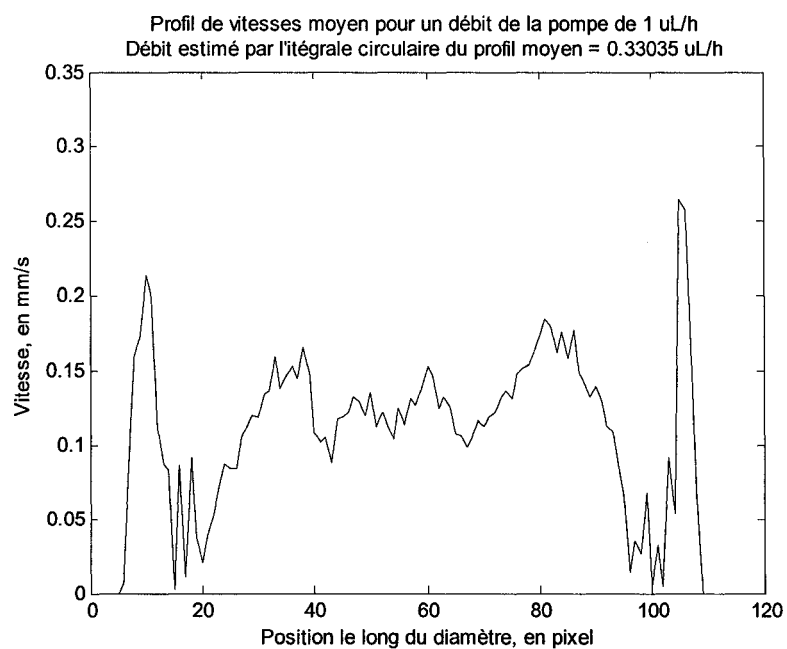


Figure 47 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 1 $\mu\text{L/h}$.

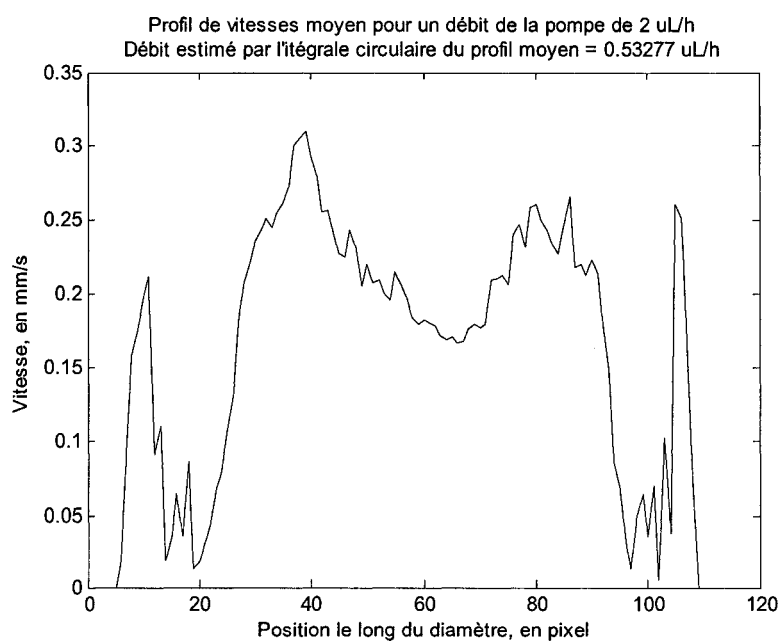


Figure 48 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 2 $\mu\text{L/h}$.

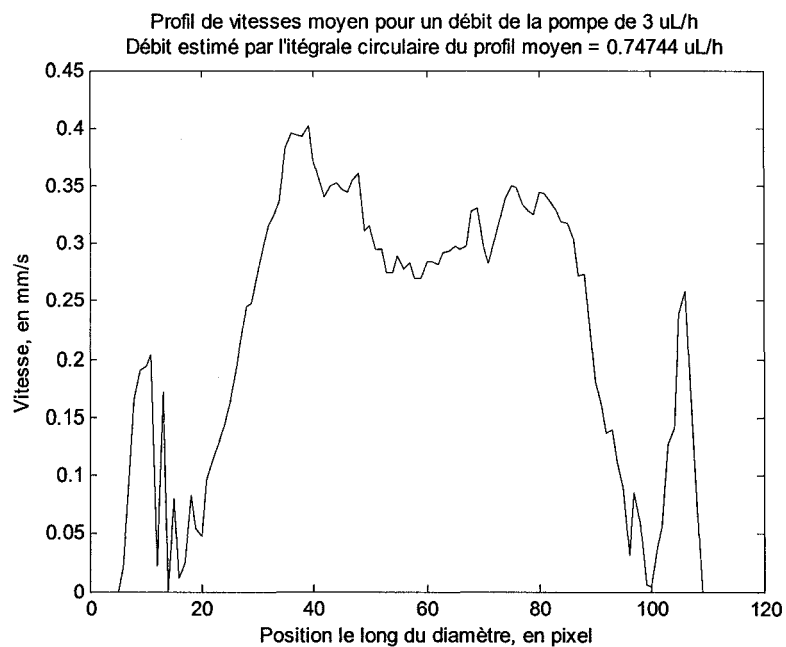


Figure 49 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 3 $\mu\text{L/h}$.

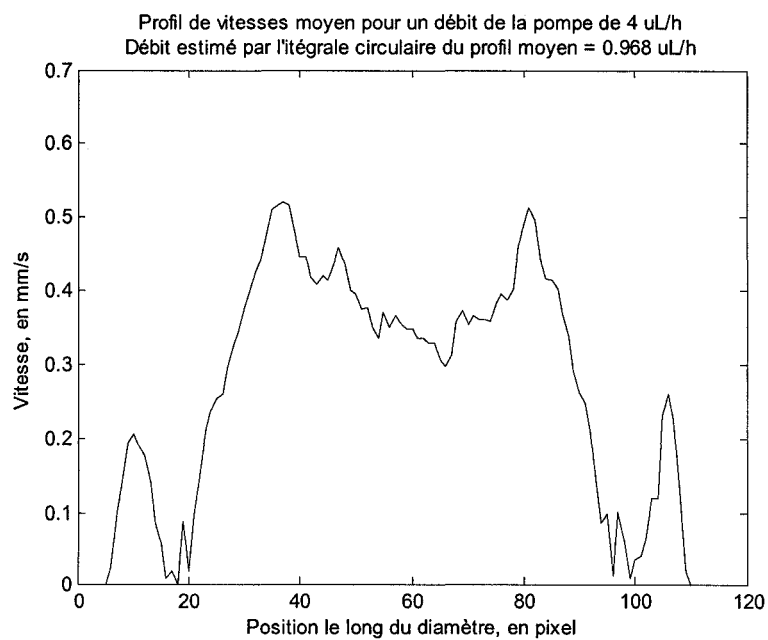


Figure 50 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 4 $\mu\text{L/h}$.

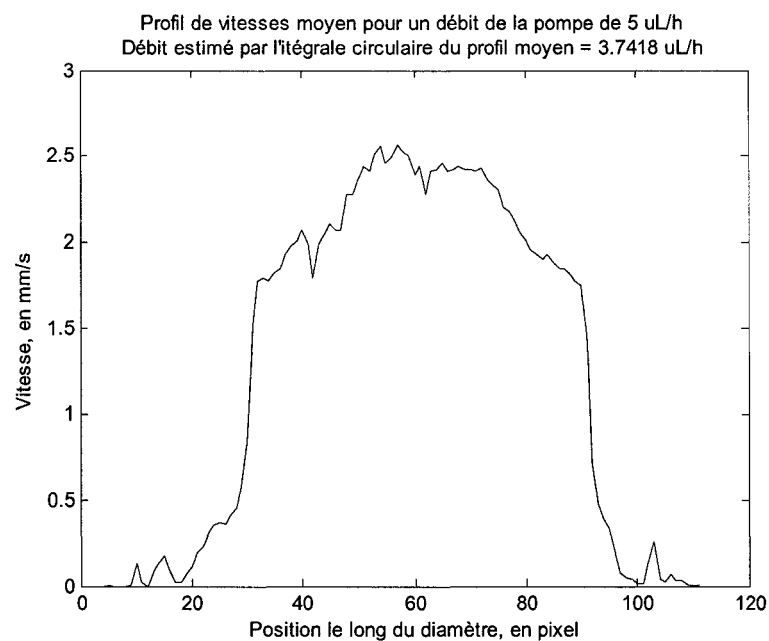


Figure 51 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 5 $\mu\text{L/h}$.

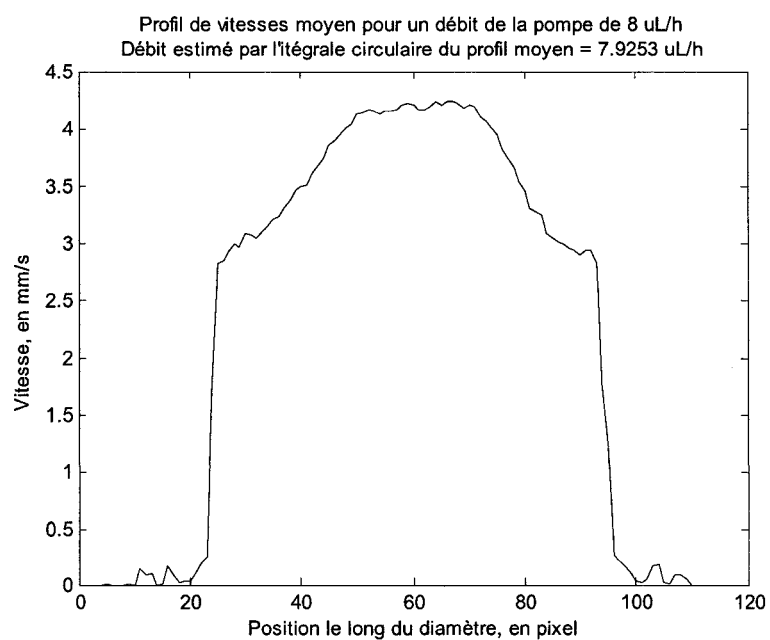


Figure 52 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 8 $\mu\text{L/h}$.

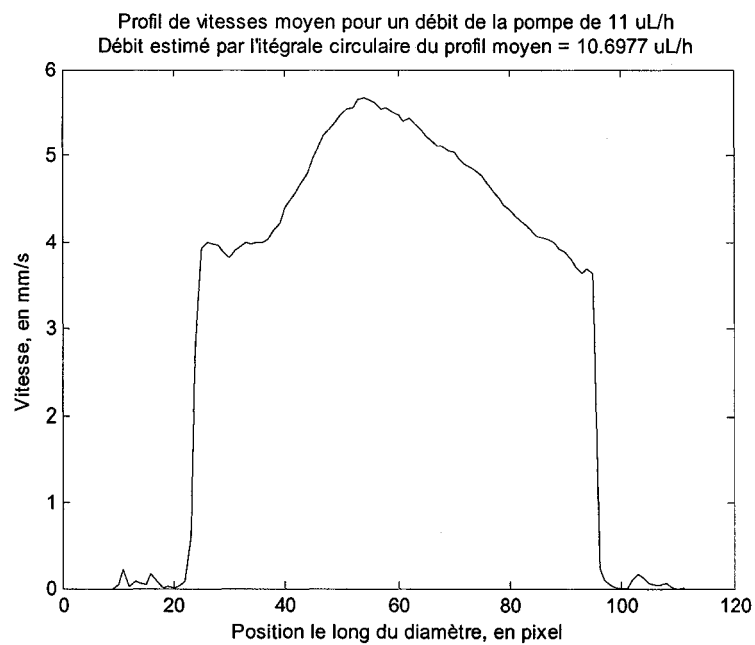


Figure 53 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 11 $\mu\text{L/h}$.

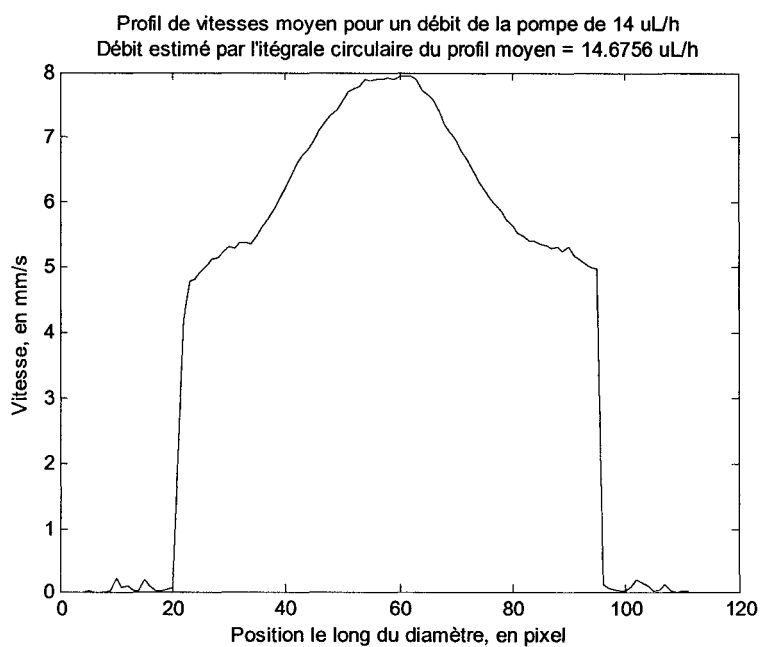


Figure 54 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 14 $\mu\text{L/h}$.

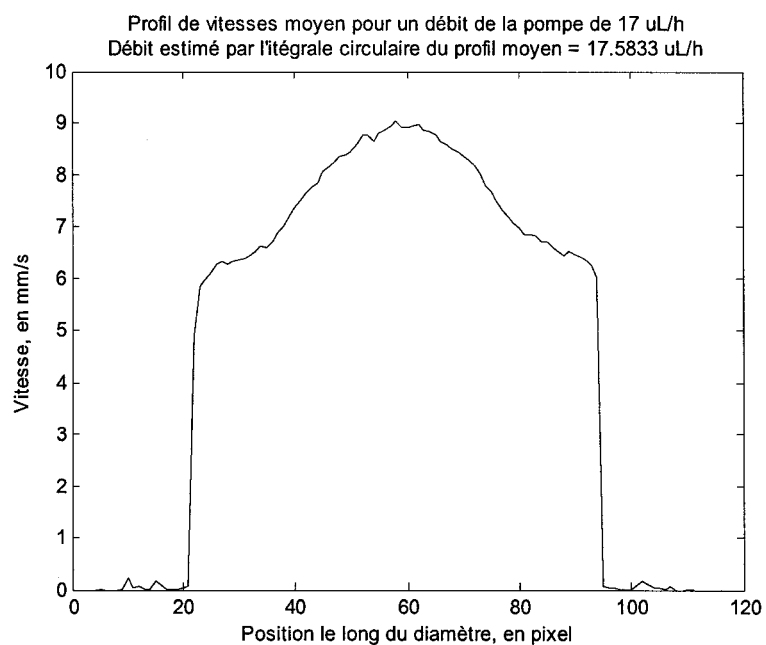


Figure 55 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 17 $\mu\text{L/h}$.

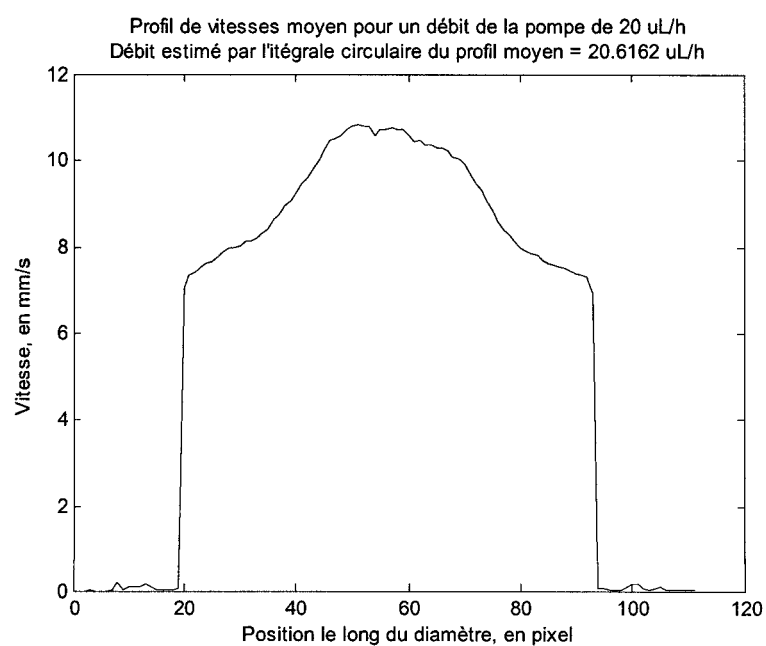


Figure 56 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 20 $\mu\text{L/h}$.

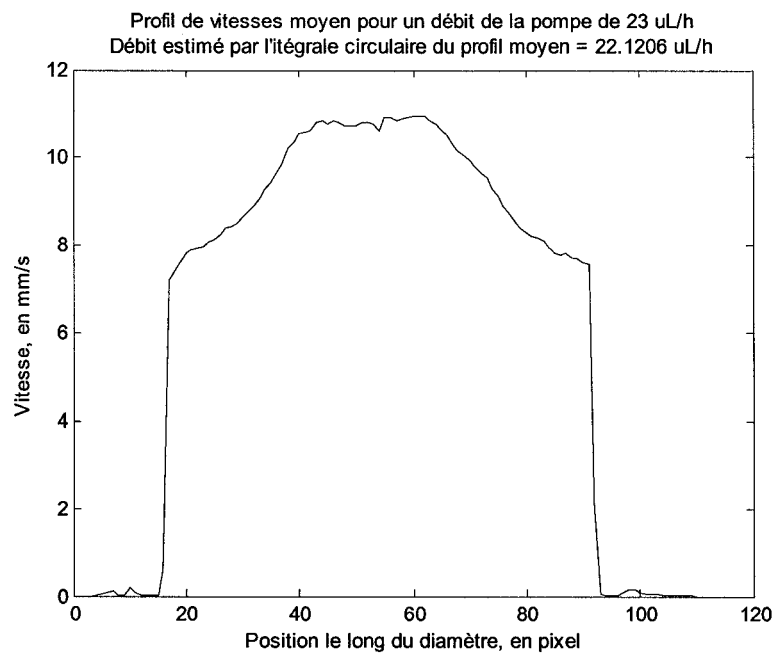


Figure 57 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 23 $\mu\text{L/h}$.

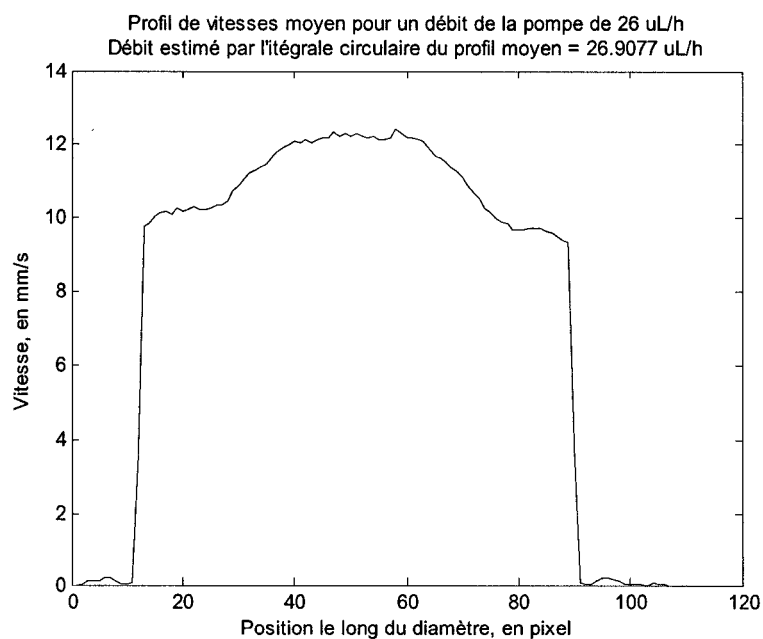


Figure 58 Profil de vitesses moyen et débit estimé pour un débit de 26 $\mu\text{L/h}$.

BIBLIOGRAPHIE

- Angele, K. P., Y. Suzuki, et al. (2005). "Development of a high-speed scanning micro PIV system using a rotating disc." *Meas. Sci. Technol.* **17** :1639-1646.
- Bagchi, P., P.C. Johnson, et al. (2005). "Computational fluid dynamic simulation of aggregation of deformable cells in a shear flow." *Transation of the ASME* **127**: 1070-1080.
- Barron, J. L., D. J. Fleet, et al. (1994). "Performance of optical flow techniques." *IJCV*. **12**(1) : 43-77.
- Bishop, J. J., P. R. Nance, et al. (2004). "Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules." *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiolol.* **286**: H113-H120.
- Bishop, J. J., R. P. Nance, et al. (2001). "Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules." *Am J Physiol Heart Circ. Physiol.*: H222-H236.
- Bishop, J. J., A. S. Popel, et al. (2001). "Rheological effects of red blood cells aggregation in the venous network: a review of recent studies." *Biorheology*. **38**(2-3): 263-274.
- Bitsch, L., L. H. Olesen, et al. (2005). "Micro particle-image velocimetry of bead suspensions and blood flows." *Experiments in Fluids*. **39**(3): 505-511.
- Boryczko, K., W. Dzwinel, et al. (2003). "Dynamical clustering of red blood cells in capillary vessels." *J.Mol.Mode.* **9**: 16-33.
- Carris, L. (2006). "The Microscope." Accédé le 2006/10/22, sur le site [http://classes.plantpath.wsu.edu/plp521/Word 20documents/421lab1.doc](http://classes.plantpath.wsu.edu/plp521/Word%20documents/421lab1.doc)
- Cheezum, M. K., W. F. Walker, et al. (2001). "Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles." *Biophysical Journal*. **81**: 2378-2388.
- Chen, J. and Z. Huang (1996). "Analytical model for effects of shear rate on rouleau size and blood viscosity." *Biophysical Chemistry*. **58**: 273-279.
- Cowen, E. A. and J. K. Sveen (2003). "Quantitative Imaging Techniques and Their Application to Wavy Flows " *PIV and Water Waves*. *World Scientific*. 352.

- Dalsa. (2007). "CCD vs. CMOS." Accédé le 2007/01/12 sur le site http://www.dalsa.com/markets/ccd_vs_cmos.asp.
- Damiano, E. R., D. S. Long and M. L. Smith. (2004). "Estimation of viscosity profiles using velocimetry data from parallel flows of linearly viscous fluids: Application to microvascular haemodynamics." *Journal of Fluid Mechanics*. **512**: 1-19.
- Davidson, M. W. and F. S. University. (2004). "Molecular Expressions " Willebrord Snell., Accédé le 2006/3/12, sur le site <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/snell.html>.
- Delepine, L. (2000). "Microscopie." Accédé le 2005/10/12, sur le site <http://webiologie.free.fr/techniques/microscopie/>
- Drochon, A. (1990). "Determination of the red blood cell apparent membrane elastic modulus from viscometric measurements." *J. Biomed. Engineering*. **112**: 241-246.
- Dzwinel, W., K. Boryczko, et al. (2003). "A discret-particule model of blood dynamics in capillary vessels." *J. Colloid Interface Sci*. **258**: 163-173.
- Einstein, A. (1905). "On the mouvement of small particules suspended in a stationary liquid demanded dy the molecular-kinetic theory of heat. in theory of Brownian mouvement." *Dover publication.*: 1-18.
- Embury, S. H., N. Mohandas, et al. (1999). "In vivo blood flow abnormalities in the transgenic knockout sickle cell mouse " *J Clin Invest*. **103**(6): 915-920.
- Fahraeus, R. (1958). "The influence of the rouleau formation of the erythrocytes on the rheology of the blood." *Acta Med Scand*. **161**(2): 151-165.
- Farabee, M. J. (2006). "Online biology book, The circulatory system. " Accédé le 2006/10/12, sur le site <http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/BIOBK/BioBookcircSYS.html>
- Fenech, M., D. Garcia, et al. (soumis). "A particle dynamic model of red blood cell aggregation kinetics." *Biophysical Journal*.
- Fontaine, I., D. Savéry, et al. (2002). "Simulation of ultrasound backscattering by red cell aggregates : Effect of shear rate and anisotropy." *Biophysical Journal*. **82**: 1696-1710.
- Foster, B. (2002). "Koehler illumination : an age-old technique impacts modern digital imaging." *American Clinical Laboratory*. **21**(6): 8-13.

- Fung, Y. C. (1993). "*Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*". Berlin Heidelberg New York, Springer.
- Haralick, R. M. and S. G. Shapiro (1993). "Computer and Robot Vision.", Addison, Wesley.
- Helbing, D., I. Farkas, et al. (2000). "Computing features of escape panic: clogging, herding, and optimal strategy." *Nature*. **407**: 487-490.
- Ishikawa, M., E. Sekizuka, et al. (1998). "Measurement of RBC velocities in the rat pial arteries with an image-intensified high-speed video camera system." *Microvascular Research*. **65**: 166-172.
- Ismailov, R. M., N. A. Shevchuk, et al. (2005). "Mathematical model describing erythrocyte sedimentation rate. Implications for blood viscosity changes in traumatic shock and crush syndrome." *BioMedical Engineering OnLine*. **4**(24).
- Jeong, J. H., Y. Sugii, et al. (2006). Measurement of RBC deformation and velocity in capillaries in vivo. *Microvascular Research*. **71**(3): 212-217
- Johnson, P. C., J. J. Bishop, et al. (1999). "Effects of red cell aggregation on the venous microcirculation." *Biorheology*. **36**(5-6): 457-460.
- Kim, S., A. S. Popel, et al. (2005). "Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules." *Am. J. Physiol heart circ Physiolol*. **288**: H584-H590.
- Koutsiaris, A. G., D. S. Mathioulakis, et al. (1999). "Microscope PIV for velocity-field measurement of particle suspensions flowing inside glass capillaries." *Measurement Science & Technology*. **10**(11): 1037-1046.
- Koutsiaris, A. G. and G. Pogiati (2004). "Velocity pulse measurements in the mesenteric arterioles of rabbits." *Physiological Measurement*. **25**(1): 15-25.
- Koutsouris, D., R. Guillet, et al. (1989). "Determination of erythrocyte transit times through micropores. II. Influence of experimental and physicochemical factors." *Biorheology*. **26**(5): 881-898.
- Kunkel, D. (2005). Dennis Kunkel Microscopy, inc. Accédé le 2006/02/09, sur le site <http://www.denniskunkel.com>
- Lim, B., P. A. J. Bascom, et al. (1997). "Simulation of red blood cell aggregation in shear flow." *Biorheology*. **34**: 423-441.

- Lima, R. (2006). "Confocal micro-piv measurements of three-dimensional profiles of cell suspension flow in a square microchannel." *Meas. Sci. Technol.* **17**: 797-808
- Liu, Y., L. Zhang, et al. (2004). "Coupling of Navier-Stokes equation with protein molecular dynamics and application to hemodynamics." *Int. J. for Numerical Methods in Fluids*. **46**: 1237-1252.
- Lominadze, D. and G. McHedlishvili (1999). "Red Blood Cell Behavior at Low Flow Rate in Microvessels." *Microvascular Research*. **58**(2): 187-189.
- Lucas, B. D. and T. Kanade (1981). "An iterative image registration technique with an application to stereo vision." *Proceedings of Imaging Understanding Workshop*: 121-130.
- Meinhart, C. D. (2000). "Volume illumination for two-dimensional particle image velocimetry." *Meas. Sci. Technol.* **11**: 809-814.
- Meinhart, C. D., S. T. Wereley, et al. (1999). "PIV measurements of a microchannel flow." *Experiments in Fluids*. **27**(5): 414-419.
- Nakano, A. (2003). "Measurement of red cell velocity in microvessels using particle image velocimetry (PIV) " *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. **29**(3-4): 445-455.
- Nyquist H. (1928). "Certain topics in telegraph transaction theory" *Transaction of the A.I.E.E.* : 617-644.
- Olsen, M. G. and R. J. Adrian (2000). "Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry." *Exp. in Fluids*. **29**: s166-s174.
- Otsu, N. (1979). "A threshold selection method from gray-level histograms." *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*. **9**(1): 62-66.
- Parthasarathi, A. A., S. A. Japee, et al. (1999). "Determination of red blood cell velocity by video shuttering and image analysis." *Annals of Biomedical Engineering*. **27**(3): 313-325.
- Patumraj, S., P. Yoysungnoen, et al. (2005). "Tumor neocapillary density in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice model" *Clinical Hemorheology and Microcirculation Issue*. **33**(2): 137-144.
- Popel, A. S. and P. C. Johnson. (2005). "Microcirculation and hemorheology", *Annual Review of Fluid Mechanics*. **37**: 43-69.

- Raffel, M., C. E. Willert, et al. (1998). "Particle Image Velocimetry, a practical guide." Berlin, Springer.
- Satake, S. i., T. Kunugi, et al. (2005). "Three-Dimensional Flow Tracking in a Micro Channel with High Time Resolution Using Micro Digital-Holographic Particle-Tracking Velocimetry." *Optical Review*. **12**(6): 442-444.
- Scarano, F. (2003). "Theory of non-isotropic spatial resolution in PIV." *Exp. in Fluids*. **35**: 268-277.
- Schmid-Schonbein, G. W. (1999). Biomechanics of microcirculatory blood perfusion. *Annual Rev. Biomed. Eng.* **1**: 73-102.
- Schunck, B. G. and B. K. Horn (1981). "Constraints on optical flow computation" *IEEE Comput Soc Press.*: 205-210.
- Sethian, J. A. (2001). "Level set methods and Fast matching methods." Cambridge (U.K.), Cambridge University Press.
- SGE. (2006). "Microtubes." Accédé le 2006/03/08, sur le site www.sge.com
- Shevkoplyas, S., T. Y. Sean C. Gifford, Mark W Bitensky, (2002). "Prototype of an in vitro model of the microcirculation." *Microvascular Research*. **65**: 132-136.
- Shin, M., K. Matsuda, et al. (2004). "Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane)." *Biomedical Microdevices*. **6**(4): 269-278.
- Smith, M. L., D. S. Long, et al. (2003). "Near-wall u-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo." *Biophysical Journal*. **85**: 637-645.
- Stoyanova, E. (2004). "Caractérisation des désordres microcirculatoires par techniques d'imageries chez des souris transgéniques bêta-thalassémiques et drépanocytaires." *IGB*. Montréal, Université de Montréal. (mémoire de maîtrise): 143.
- Sugii, Y., S. Nishio, et al. (2002). "In vivo PIV measurement of red blood cell velocity field in microvessels considering mesentery motion." *Physiological Measurement*. **23**(2): 403-416.
- Sugii, Y., S. Nishio, et al. (2000). "A highly accurate iterative PIV technique using a gradient method." *Measurement Science & Technology*. **11**(12): 1666-1673.

- Sugii, Y., K. Okamoto, et al. (2001). "Evaluation of Velocity Measurement in Micro Tube by Highly Accurate PIV Technique.", *Meas. Sci. Technol.* **16**:1126-1130.
- Sugii, Y., R. Okuda, et al. (2005). "Velocity measurement of both red blood cells and plasma of in vitro blood flow using high-speed micro PIV technique." *Measurement Science & Technology*. **16**(5): 1126-1130.
- Sveen, J. K. (2004). "An introduction to MatPIV v.1.6.1." Accédé le 2005/10/15 sur le site <http://www.math.uio.no/~jks/matpiv/index2.html>.
- Toro, J., B. Chayer, et al. (2006). "Estimation of microcirculatory blood flow velocity profiles." *9th MICCAI Conference*: 74 -77.
- Tsukada, K., H. Minamitani, et al. (1996). "Blood flow measurement system for microcirculation by image correlation method." *18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. **2**: 684-685.
- Tsukada, K., H. Minamitani, et al. (2000). "Image correlation method for measuring blood flow velocity in microcirculation: correlation 'window' simulation and in vivo image analysis." *Physiological Measurement*. **21**(4): 459-471.
- Umetani, J., C. Yuzawa, et al. (1989). "Microvascular red blood cell velocity measurement using the image gradient method." *IEEE Engineering in Medicine & Biology Society, 11th annual international conference, Image Processing*. **2**: 624-625
- Wereley, S. T. and C. D. Meinhart (2005). "Micron-Resolution Particle Image Velocimetry. Micro- and Nano-Scale Diagnostic Techniques." K. Breuer. New York, Springer-Verlag.
- Wereley, S. T., J. G. Santiago, et al. (1998). "Micro-resolution particle image velocimetry.", San Jose, CA, United States, *The International Society for Optical Engineering*. **3258**: 122-133
- Westerweel, J. (1997). "Fundamentals of digital particle image velocimetry." *Measurement Science & Technology*. **8**(12): 1379-1392.
- Xu, C. and J. L. Prince (1998). "Snakes, Shapes, and Gradient Vector Flow". *IEEE Transactions on Image Processing*. **7**: 359-369.
- Yamakawa, T. (1987). "White blood cell plugging and blood flow maldistribution in the capillary network of cat cerebral cortex in acute hemorrhagic hypotension: an intravital microscopic study." *Circ.Shock*. **22**(4): 323-332.

Zeiss. (2006). "A Long Story of Success." Accédé le 2006/01/22, sur le site <http://www.zeiss.com/micro>.